



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πτυχιακή εργασία για το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέτρηση Ειδικής Δραστικότητας (U/g) Οξειδοαναγωγάσης Ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε Λεμφοκύτταρα Ασθενών με Πνευμονική ίνωση

ΡΟΣΣΙ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ



Λάρισα, 2019

Μέτρηση Ειδικής Δραστικότητας (U/g)
Οξειδοαναγωγάσης Ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε
Λεμφοκύτταρα Ασθενών με πνευμονική ίνωση

Assessment of NADH: Ubiquinone Oxidoreductase
(Complex I) activity in lymphocytes of patient with
pulmonary fibrosis

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιολογίας- Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA	Επίκουρος καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ	Αναπληρώτρια καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019. Η εργασία πραγματοποιήθηκε κάτω από την επίβλεψη της κ. Αιμιλίας Ζίφα και της κ. Άννας-Μαρίας Ψαρρά, τις οποίες θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή βοήθειά τους και το χρόνο που διέθεσαν για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Δανιήλ για την πολύτιμη συνεργασία και συμβολή της στην παρούσα εργασία. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους συναδέλφους Μουίκη Ανδρέα και Ποζάντζη Αγλαΐα για την άψογη συνεργασία και στήριξη κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους κυρίους Δημήτρη Κουρέτα και Δημήτρη Μπόγδανο, καθώς και στα μέλη των εργαστηρίων τους για την άριστη συνεργασία και βοήθειά τους στη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- Πνεύμονας.....	7
Φυσιολογική δομή και λειτουργία.....	7
Πνευμονική φυσιολογία και ασθένειες.....	7
1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	7
1.2 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....	8
1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	9
1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	12
1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	13
1.6 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	16
1.6.1. Μιτοχονδριακό DNA.....	16
1.6.2. mtROS.....	17
1.6.3. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.....	18
1.7 ΣΤΟΧΟΣ.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	20
2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	23
2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια με πρωταρχική λειτουργία την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο με τη μορφή ATP. Τα τελευταία χρόνια αρκετές φλεγμονώδεις πνευμονολογικές διαταραχές έχουν συνδεθεί με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, καθώς έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων σε ασθένειες όπως η πνευμονική ίνωση, η σαρκοείδωση και το άσθμα. Η πνευμονική ίνωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί εμφάνιση ουλώδους ιστού στο πνευμονικό επιθήλιο οδηγώντας σε εμφάνιση δομής «κηρήθρας». Μεταλλάξεις στο mt-tRNA μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας με πιθανή συνέπεια την αύξηση των μιτοχονδριακών ROS που με τη σειρά τους επάγουν τη φλεγμονή και ενισχύουν τα συμπτώματα της ίνωσης. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ λειτουργικότητας αναπνευστικής αλυσίδας και εμφάνισης της νόσου. Για το λόγο αυτό έγινε μια συγκριτική μελέτη προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του οξειδοαναγωγικού ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη ασθένεια, καθώς και από υγιή άτομα. Η εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγάσης του Συμπλόκου I επιτεύχθηκε με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της οξείδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I, αντίδραση που αναστέλλεται από τη ροτενόνη. Τελικά, παρόλο που η έρευνα βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο, είναι εμφανής η μειωμένη λειτουργικότητα του Συμπλόκου I σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση σε σύγκριση με υγιή άτομα.

ABSTRACT

Mitochondria are semi-autonomous cellular organelles with a primary function of producing energy in the cell in the form of ATP. In recent years, several inflammatory pneumococcal disorders have been associated with mitochondrial dysfunction, as mutations in mitochondrial genes have been observed in diseases such as pulmonary fibrosis, sarcoidosis and asthma. Pulmonary fibrosis is an autoimmune disorder that causes scar tissue to develop into the pulmonary epithelium resulting in a "honeycomb" structure. Mutations in the mt-tRNA can lead to dysfunction of the respiratory chain complexes with potential consequence the increase of mitochondrial ROS which in turn induce inflammation and enhance the symptoms of fibrosis. In the present study we investigated the possible correlation between respiratory chain functionality and disease incidence. For this reason, a comparative study was conducted to determine the enzymatic activity of the redox pair NADH-Q (Complex I) in peripheral blood lymphocytes of individuals suffering from this disease as well as by healthy individuals. The evaluation of the activity of the complex I oxidoreductase was achieved by spectrophotometric determination of NADH oxidation from Complex I, a reaction inhibited by rotenone. Ultimately, while research is still at an early stage, the reduced functionality of Complex I in patients with pulmonary fibrosis is evident compared to healthy subjects.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Πνεύμονας

Φυσιολογική δομή και λειτουργία

Η πρωταρχική λειτουργία των πνευμόνων είναι η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του σώματος και του περιβάλλοντος και απαιτεί εξειδικευμένη ανατομία. Αυτή περιλαμβάνει πληθώρα διακριτών επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυτταρικών πληθυσμών, που υποστηρίζονται από ιστοειδικούς πληθυσμούς λευκοκυττάρων, και ποικιλία μεσεγχυματικών κυττάρων που παρέχουν δομική υποστήριξη. Η μοναδική ανατομία των πνευμόνων έγκειται σε ένα δέντρο από αεραγωγούς και βρόγχους που συμπλέκονται με δέντρα αγγείων αίματος και λέμφου. (Hogan BLM, 2014)

Οι πνεύμονες μεγαλώνουν σταδιακά μέχρι την πρώιμη ενηλικίωση, και η πνευμονική λειτουργία γίνεται βέλτιστη μεταξύ 18 και 25 ετών. Μετά από αυτή την κορυφή, η πνευμονική λειτουργικότητα ξεκινά να μειώνεται, αυτό σχετίζεται με τη δομική αναδιαμόρφωση του πνεύμονα, τη σταδιακή απώλεια κυψελιδικής επιφάνειας και την αύξηση του μεγέθους των κυψελίδων (Partridge L, 2018), ως αποτέλεσμα των αλλαγών στο δίκτυο ινιδίων κολλαγόνου. (Miller MR., 2010) Επιπλέον, η απομάκρυνση της βλέννας γίνεται δυσκολότερη με την ηλικία τόσο στο άνω, όσο και στο κάτω αναπνευστικό (Proença de Oliveira-Maul J, 2013).

Πνευμονική φυσιολογία και ασθένειες

Η πνευμονική φυσιολογία μεταβάλλεται με την ηλικία, μπορεί να συνδυάζεται με τις παθολογικές αλλαγές που προκύπτουν από ποικίλες ασθένειες, και τελικά να επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία των πνευμόνων. Απώλεια της ελαστικότητας επέρχεται συνήθως με το γήρας και είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα χρόνιου άσθματος, καθώς και της χρόνιας αποφρακτικής νόσου ανεξαρτήτου ηλικίας (Gelb AF, 2002 και 2015). Η γήρανση επιφέρει αλλαγές στην έκφραση του TGF- β και τη σύνθεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τέτοιες μεταβολές εξηγούν μερικώς την αυξημένη εμφάνιση ινωτικών πνευμονικών διαταραχών στους ηλικιωμένους (Selman M, 2010). Όμως, ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επιδρούν στην πνευμονική λειτουργία είναι το οξειδωτικό στρες.

1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Ο πνεύμονας αποτελεί το κυρίαρχο όργανο που έρχεται σε μεγαλύτερη επαφή με το οξυγόνο, συνεπώς είναι πιο ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες. Ειδικότερα, η πίεση του οξυγόνου στον εισπνεόμενο αέρα είναι 150 mmHg, στις κυψελίδες μειώνεται στα 100 mmHg, ενώ στο φλεβικό αίμα φτάνει στα 45 mmHg και καταλήγει, σε ορισμένα όργανα, σε επίπεδο 1 mmHg. Ταυτόχρονα, οι πιθανότητες δημιουργίας οξειδωτικών παραγόντων αυξάνονται λόγω της μεγάλης επιφάνειας του πνεύμονα, περίπου 70 m στον ενήλικα. Ωστόσο, οι πνεύμονες εκτός από το οξυγόνο δέχονται και πολλά άλλα ερεθίσματα που μπορεί να συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες, όπως κάπνισμα, όζον, διοξείδιο αζώτου και θείο (Sies Helmut, 2000).

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής οξειδωτικών παραγόντων, και κυρίως δραστικών ριζών οξυγόνου, και εξουδετέρωσης από αντιοξειδωτικούς παράγοντες, υπέρ των οξειδωτικών, μπορεί να καταστεί τοξική και να οδηγήσει σε βλάβες. Αυτή η ανισορροπία αποτελεί τον πυρήνα του οξειδωτικού στρες. Οι οξειδωτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες δραστικού οξυγόνου (ROS) και τα δραστικά είδη αζώτου που παράγονται από το σώμα μας με διάφορα ενδογενή συστήματα, μετά από έκθεση σε διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες ή παθολογικές καταστάσεις (Sies Helmut, 2000).

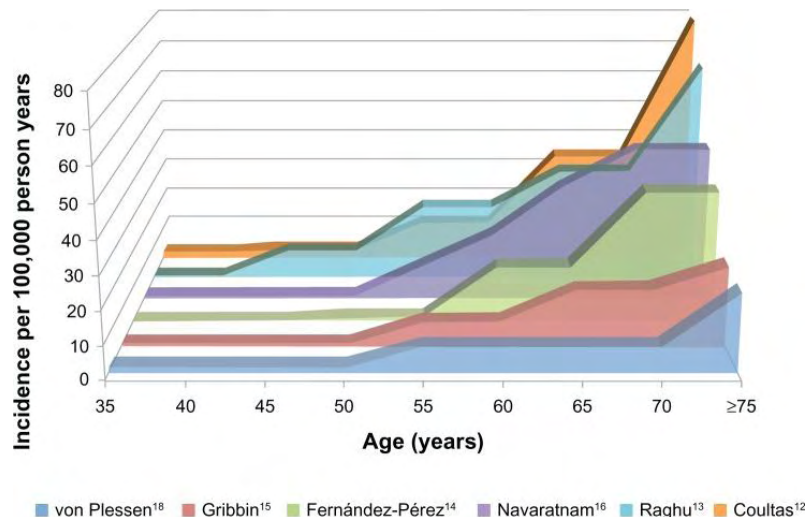
Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί άτομο, μόριο ή στοιχείο που είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και φέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα ορισμένες κοινές ιδιότητες που μοιράζονται οι περισσότερες ρίζες. Πολλές ρίζες είναι ασταθείς και άκρως αντιδραστικές. Μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να δεχθούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, επομένως συμπεριφέρονται ως οξειδωτικά ή αναγωγικά. Μια από τις πιο σημαντικές ομάδες είναι οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο (ROS) και σχετίζονται με πολλές ασθένειες. Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε σημαντικά μακρομόρια οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και ορμονική διαταραχή. Οι στόχοι των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες που είναι οι κυριότεροι στόχοι (V. Lobo, 2010).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ανισορροπία οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων στους αεραγωγούς διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης (IPF), του άσθματος, της σαρκοείδωσης και πολλών άλλων διαταραχών της πνευμονικής λειτουργίας. Τα ινώδη ερεθίσματα άγνωστης προέλευσης πιστεύεται ότι δημιουργούν οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS (Hee Sun PARK, 2008). Οξειδωμένα λιπίδια και πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί στην εκπνοή αέρα και σε ιστούς πνεύμονα των ασθενών με ινωτική πνευμονική νόσο. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με IPF έχουν αυξήσεις τόσο στο οξειδωτικό όσο και στο νιτροδωτικό στρες. Τα οξειδωτικά μπορούν να παίζουν ρόλο στην πνευμονική ίνωση επηρεάζοντας την παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGF-β, ο οποίος είναι ένας βασικός ρυθμιστής των ανώμαλων μηχανισμών επισκευής που είναι χαρακτηριστικές για πολλές ινωτικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της IPF (Liu and Chen J Transl Med, 2017). Υπάρχουν πολλές πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του TGF-β και των οξειδωτικών / αντιοξειδωτικών στον πνεύμονα. Ο TGF-β όχι μόνο προκαλεί παραγωγή ROS με ενεργοποίηση οξειδασών NADPH ή/ και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, μεταξύ άλλων. Αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους με IPF. Έτσι, τα οξειδωτικά και ο TGF-β φαίνεται να αλληλοεπιδρούν για να ενισχύσουν την ινωτική απόκριση στους πνεύμονες (Hee Sun PARK, 2008).

1.2 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Η πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια χρόνια προοδευτική νόσος των πνευμόνων που χαρακτηρίζεται από σταδιακό τραυματισμό τους και την ιστολογική εικόνα της συνήθους πνευμονίας (Usual Interstitial Pneumonia). Η αιτιολογία των πνευμονικών ινωτικών ασθενειών ποικίλλει, το έναυσμα μπορεί να ανήκει σε αλλεργιογόνα, χημικά, ακτινοβολία και περιβαλλοντικά σωματίδια. Παρά την άγνωστη αιτιολογία, υπάρχουν ορισμένες συνθήκες και παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με την ασθένεια, συμπεριλαμβανομένων: το κάπνισμα, τους επαγγελματικούς κινδύνους και τις ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις. Σχετίζεται με

αυξημένο βήχα και δύσπνοια που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής (Martinez FJ, 2017). Η IPF εκδηλώνεται σε περίπου 3 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, με δραματική αύξηση των περιστατικών με την ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, τα ποσοστά των ασθενών αυξάνονται για ηλικίες άνω των 65 (Brett Ley and Harold R Collard, 2013). Οι περισσότερες μελέτες εμφανίζουν μια αυξημένη προδιάθεση στους άνδρες.



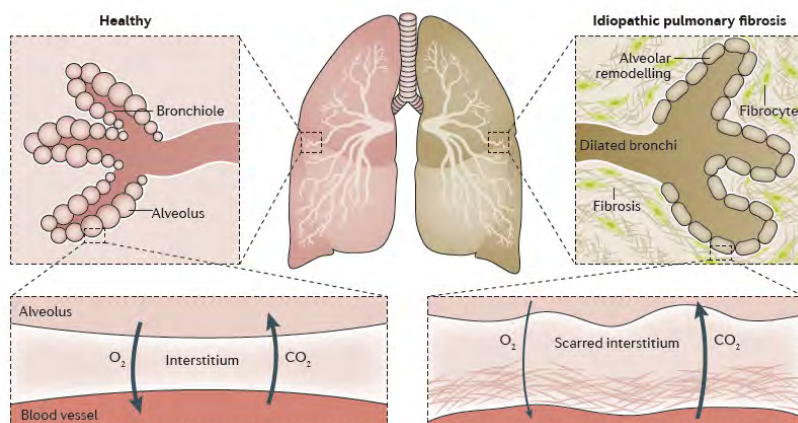
Διάγραμμα 1. Συσχέτιση της ηλικίας με την εμφάνιση της ασθένειας σε μελέτες ερευνητών από διάφορες περιοχές του κόσμου (Brett Ley and Harold R Collard, 2013).

Η ίνωση φαίνεται να ξεκινά από τη βάση και την περιφέρεια των πνευμόνων, προχωρώντας σταδιακά για να συμπεριλάβει όλους τους πνευμονικούς ιστούς. Για πολλά χρόνια η IPF αντιμετωπιζόταν ως φλεγμονώδης ασθένεια, δεδομένων των υψηλών επιπέδων φλεγμονωδών κυττάρων στους πνεύμονες. Τελευταία στοιχεία, όμως, υποδεικνύουν ότι είναι μια ασθένεια που υποκινείται από το επιθήλιο. Συνεπώς, το υπερ-ενεργοποιημένο επιθήλιο παράγει μεσολαβητές μετανάστευσης ινοβλαστών, συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίησή τους σε ενεργούς μυοϊνοβλάστες. Αυτοί εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που τελικά αναδιαμορφώνουν τη δομή των πνευμόνων, προκαλώντας εμφάνιση δομής «κρηθράς». Η παθοβιολογία της είναι πολύπλοκη και εικάζεται ότι οδηγείται από την απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων λόγω της γήρανσης, των γενετικών και επιγενετικών παραγόντων και την επανενεργοποίηση των αναπτυξιακών μονοπατιών σηματοδότησης.

1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η αποδιοργάνωση του πνευμονικού παρεγχύματος στην πνευμονική ίνωση προκαλείται από χρόνια κυψελίτιδα που κυριαρχείται από κυψελιδικά μακροφάγα και ουδετερόφιλα, περιλαμβάνοντας επίσης λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα και, σε πολύ μικρότερο βαθμό, βασεόφιλα και μαστοκύτταρα. Είναι πιθανό η φλεγμονώδης διαδικασία να παρακινείται, τουλάχιστον μερικώς, από ανοσοσυμπλέγματα που παράγονται στην κατώτερη αναπνευστική οδό. Τα ανοσοσυμπλέγματα αλληλοεπιδρούν με τα κυψελιδικά μακροφάγα και επιτρέπουν την διαρκή ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων. Ταυτόχρονα, ενεργοποιείται και η φλεγμονώδης απόκριση του παρεγχύματος που απελευθερώνει ενδιάμεσα που ενισχύουν την

φλεγμονώδη διαδικασία. Τελικά, οι ανωτέρω διαδικασίες στην κατώτερη αναπνευστική οδό προκαλούν σταδιακό τραυματισμό στο πνευμονικό παρέγχυμα και διεγείρουν την συσσώρευση μεσεγχυματικών κυττάρων.

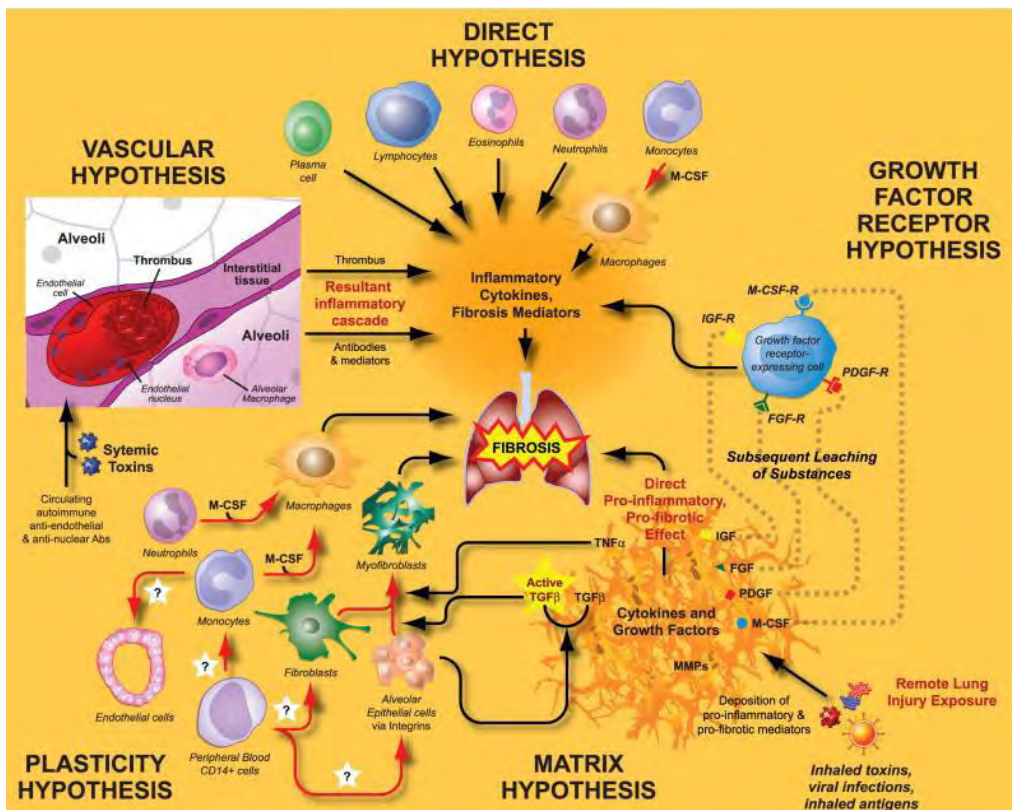


Εικόνα 1. Κυψελιδική βλάβη στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Η IPF έχει ως αποτέλεσμα τη διάταση των βρόγχων, την ανασύνθεση των κυψελίδων και η παρεγχυματική ίνωση, οι οποίες επηρεάζουν την ανταλλαγή αερίων (ιδιαίτερα οξυγόνωση). (Fernando J. Martinez, 2017)

Το προφίλ κυτοκινών από βιοψία ή από κύτταρα προερχόμενα από βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BAL) ασθενών με πνευμονική ίνωση είναι πλούσιο σε προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. IL-1 β , IL-8, IL-18, TNF α , καθώς και κυτοκίνες τύπου 2 και οι υποδοχείς αυτών. (MS Wilson and TA Wynn, 2009) Το προφίλ μικτών κυτοκινών, προερχόμενο κυρίως από φλεγμονώδη κύτταρα και λευκοκύτταρα, μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις σε όλες τις απόψεις της επούλωσης των πληγών, περιλαμβανομένης της αγγειακής αναδιαμόρφωσης, της διαφοροποίησης των μυοϊνοβλαστών, της παραγωγής EMT (epithelial – mesenchymal transition), TGF β και IL-13. Εκτός από τις άμεσες ιδιότητες των ινοβλαστών να ενεργοποιούν τους TGF β και IL-13, παρατηρήθηκε η ταυτόχρονη έκφραση αυτών των δύο κυτοκινών στην IPF (Murray LA, 2008). Η υπερπλασία των ινοβλαστών και η μειωμένη έκφραση των αποπτωτικών μηχανισμών στην IPF μπορεί περαιτέρω να αυξήσουν την ινωτική απόκριση. Συλλογικά, ένας καταρράκτης από αποτυχημένους ρυθμιστικούς μηχανισμούς και υπερ-έκκριση κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων (Agostini C, Gurrieri C, 2006), κορυφώνεται με απόκριση επούλωσης τραύματος που προκαλείται από ινοβλάστες εκτός ελέγχου. Φυσιολογικά, η IPF μπορεί να διακυβεύσει δραματικά τη διάχυση του οξυγόνου, τη λειτουργία των πνευμόνων και είναι συνήθως μια θανατηφόρα ασθένεια (MS Wilson and TA Wynn, 2009).

Κυτοκίνες	Λειτουργία
IL-1 β	Φλεγμονώδης, προάγει την ενεργοποίηση, συνδιέγερση και έκκριση κυτοκινών και άλλων πρωτεϊνών οξείας φάσης, πυρετογόνο
IL-8	Χημειοτακτικός παράγοντας για τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα
IL-13	Ενεργοποίηση λαγνοειδών κυττάρων στον πνεύμονα και το έντερο, πολλαπλασιασμό και προώθηση της παραγωγής IgE, ρύθμιση της ανοσίας μεσολαβούμενης από κύτταρα
IL-18	Προφλεγμονώδες, επαγωγή IFN γ
TNF α	Φλεγμονώδης, προάγει την ενεργοποίηση και την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης
TGF β	Ρυθμιστική, αναστέλλει την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση. συνεργάζεται με την IL-6

Πίνακας 1. Κυτοκίνες και λειτουργία (<https://www.sinobiological.com/Cytokine-Review-Receptor-Source-Targets-Main-Function-Disease-Association-a-1310.html>)



Εικόνα 2. Φλεγμονή και πνευμονική ίνωση

Πολλοί μεσολαβητές της φλεγμονής έχουν εμπλακεί στην παθογένεση της IPF. Αυτή η επισκόπηση προτείνει πέντε πιθανές υποθέσεις για την παθογένεση της IPF. (Α) Η υπόθεση της άμεσης φλεγμονής υποδηλώνει ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα καταστρέφουν άμεσα τους ιστούς μέσω ουσιών όπως οι ελαστάσες, καθώς επίσης και οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν αυτή τη διαδικασία. (Β) Η υπόθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, στην οποία οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που απελευθερώνονται ως αποτέλεσμα ενός μακρινού τραυματισμού παγιδεύονται στην πνευμονική εξωκυτταρική μήτρα. Αυτό οδηγεί σε ένα παρατεταμένο και ενισχυμένο μηχανισμό επιδιόρθωσης τραύματος που οδηγεί στον ινωτικό φαινότυπο. (Γ) Η υπόθεση του αυξητικού παράγοντα υποδηλώνει ότι μερικοί τύποι κυττάρων με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα σε αυτό το περιβάλλον, με αποτέλεσμα ενεργοποίηση και ενίσχυση του φλεγμονώδους καταρράκτη. Επιπρόσθετα, αυτοί οι υποδοχείς ρυθμίζονται παρουσία στεροειδών, γεγονός που υποδηλώνει τη λογική του γιατί η ανοσοκαταστολή δεν είναι επιτυχής στη θεραπεία της IPF. (Δ) Η υπόθεση πλαστικότητας υποδηλώνει ότι πολυάριθμοι κυτταρικοί τύποι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλους κυτταρικούς τύπους (για παράδειγμα, επιθηλιακά κύτταρα σε μεσεγχυματικά κύτταρα (EMT), ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα σε μακροφάγα) και αυτή η διαφοροποίηση είναι αποτέλεσμα σύνθετων αλληλεπιδράσεων φλεγμονωδών μεσολαβητών, αυξητικών παραγόντων και άλλους παράγοντες που δεν έχουν προσδιοριστεί. Αυτά τα ενεργοποιημένα κύτταρα στη συνέχεια μεσολαβούν στον ινώδη φαινότυπο. (Ε) Η αγγειακή υπόθεση υποδηλώνει ότι κάποια αρχική ενδοθηλιακή βλάβη ενεργοποιεί τον φλεγμονώδη καταρράκτη με επακόλουθη εναπόθεση αντισωμάτων και προκύπτουσα ίνωση. (www.liebertonline.com/ars).

1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Συνήθως, οι ασθενείς με IPF εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν δύσπνοια κόπωσης, με ή χωρίς ξηρό βήχα. (Belkin et al., 2013) Ωστόσο, αυτά τα αρχικά συμπτώματα αποδίδονται κυρίως στο γήρας, την κακή φυσική κατάσταση ή άλλες συνθήκες, όπως πνευμονικό εμφύσημα ή καρδιαγγειακές νόσους. Συνεπώς, εμποδίζεται η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση (Lamas, D. J. et al., 2011). Προκειμένου να γίνει διάγνωση και να αποκλειστούν άλλα ILDs ή αλληλεπικαλυπτόμενες παθήσεις απαιτούνται εξετάσεις που περιλαμβάνουν: μελέτη κλινικών χαρακτηριστικών, ακτινογραφία θώρακος και, πιθανώς, ιστοπαθολογική εξέταση πνεύμονα. Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα είναι ασαφή συντίθεται μια ομάδα πολλαπλών ειδικοτήτων, όπως κλινικούς ιατρούς, παθολόγους και ακτινολόγους, που συνεργάζονται για να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν το ενδεχόμενο της IPF (Flaherty, K. R. et al., 2004).

Έχουν αναπτυχθεί αρκετά μοντέλα για την πρόβλεψη του κινδύνου θνησιμότητας βασισμένα σε δημογραφικά, κλινικές, ακτινολογικές και βιολογικές παραμέτρους (Wells, A. et al., 2003). Ένα εύχρηστο μοντέλο είναι το GAP που ενσωματώνει το φύλο, την ηλικία και τη φυσιολογία των πνευμόνων του ατόμου ως μεταβλητές. Το μοντέλο GAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των ασθενών σε 3 στάδια της νόσου με διακριτό κίνδυνο θνησιμότητας μεγαλύτερο από 1-3 χρόνια.(Ley, B. et al., 2012).

Όπως γίνεται με πολλές χρόνιες διαταραχές, η διαχείριση των ασθενών με πνευμονική ίνωση επικεντρώνεται στην βελτίωση των συμπτωμάτων, τη διατήρηση της πνευμονικής λειτουργίας, την ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιπτώσεων της θεραπείας και, ιδανικά, στην

αύξηση του ποσοστού επιβίωσης (Martinez et al., 2017). Η θεραπεία μπορεί να περιλαμβάνει φάρμακα. Ιδιαίτερης προσοχής χρήζει ο πιθανός συνδυασμός τους, καθώς υπάρχουν κάποιοι συνδυασμοί που πρέπει να αποφεύγονται και άλλοι που απορρίπτονται προς αποφυγή δυσμενών επιπτώσεων. Ωστόσο, υπάρχουν και μη-φαρμακολογικές θεραπείες. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει πνευμονική αποκατάσταση, μακροπρόθεσμη οξυγονοθεραπεία, μεταμόσχευση, μηχανικό αερισμό και άλλα. Βέβαια, η πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι ο συνδυασμός των δυο προσεγγίσεων (Martinez et al., 2017).

Box 2 | The 2015 ATS/ERS/JRS/ALAT guidelines

Conditional recommendation for use

- Pirfenidone
- Nintedanib
- Antacid therapy

Conditional recommendation against use

- Dual endothelin receptor antagonists (macitentan and bosentan)
- Phosphodiesterase-5 inhibitor (sildenafil)
- N-Acetylcysteine monotherapy

Strong recommendation against use

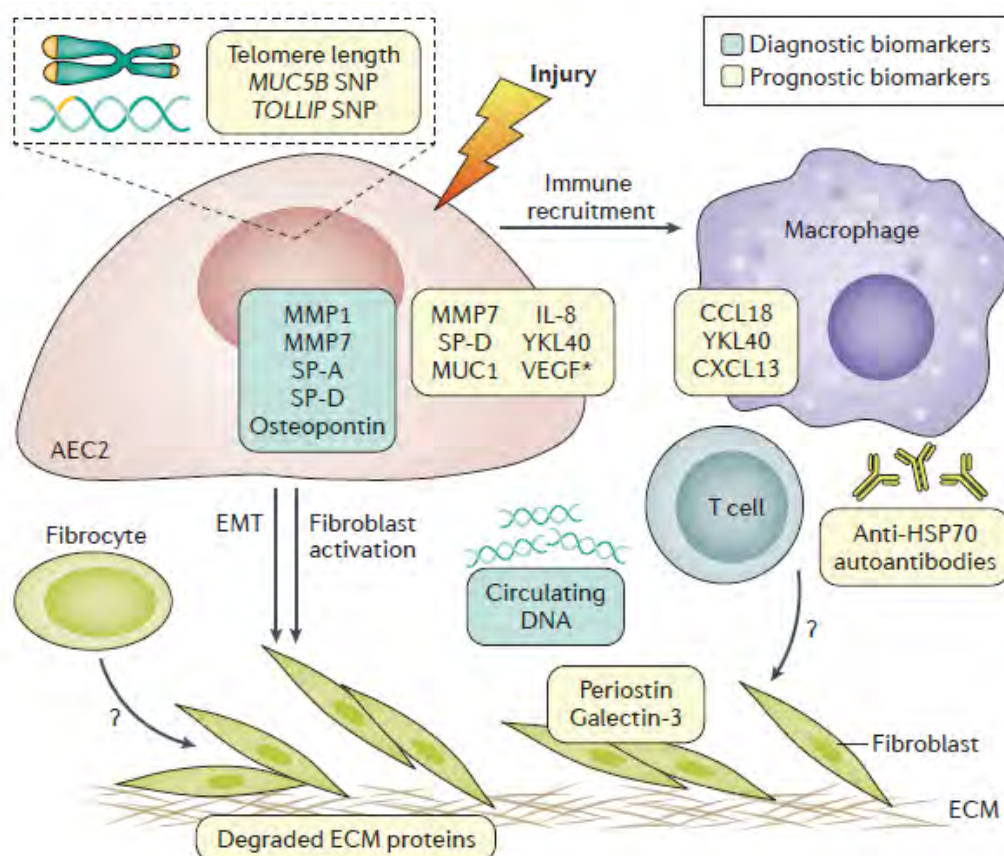
- Anticoagulation (warfarin)
- Combination prednisone, azathioprine and N-acetylcysteine
- Selective endothelin receptor antagonist (ambrisentan)
- Imatinib

The named drugs are those reviewed in the guideline¹³⁷.
ALAT, Latin American Thoracic Association; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society; JRS, Japanese Respiratory Society.

Πίνακας 2. Φαρμακολογική προσέγγιση και συνδυασμοί(Fernando J. Martinez, 2009)

1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Έχουν εντοπιστεί αρκετοί βιοδείκτες που έχουν διαγνωστικό ή προγνωστικό δυναμικό στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF). Οι διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες παρατίθενται σε μπλε και κίτρινα κουτιά αντίστοιχα, μαζί με τις υποτιθέμενες πηγές τους, τα οποία αποτελούν τα βασικά συστατικά που εμπλέκονται στην παθογένεση της IPF (δηλαδή, κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου 2 (AEC2s), ανοσοκύτταρα και ινοβλάστες). Επιπροσθέτως αυτών που παρουσιάζονται, τα ινοκύτταρα, η γαλεκτίνη-3 και το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (ICAM1) που προέρχεται από επιθήλιο μπορεί να είναι δείκτες οξείας παροξύνσης. Επιπλέον, θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες οι ομάδες βιοδεικτών. για παράδειγμα, μεταλλοπρωτεΐνωση μήτρας 7 (MMP7), ICAM1 και η IL-8 μπορεί να έχει προγνωστική αξία, ενώ ένας συνδυασμός πνευμονικής επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης D (SP-D), MMP7 και οστεοποντίνης έχει διαγνωστική αξία. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να έχει προγνωστική αξία, αλλά αυτό παραμένει ασαφές. Ομοίως, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών έχουν άγνωστη τιμή. Η προγνωστική δύναμη είναι ασαφής. (Martinez et al., 2017)



Εικόνα 5. Αναδυόμενοι βιοδείκτες στην IPF.

Η διερεύνηση των υποκλινικών διαμέσων ανωμαλιών των πνευμόνων (Interstitial Lung Abnormalities – ILAs) θα μπορούσαν να αποδειχθούν χρήσιμες για την έγκαιρη διάγνωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Martinez et al., 2017). Το 2011, μια μελέτη γονιδιακής σύνδεσης εντόπισε έναν τόπο στο χρωμόσωμα 11 που σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο

IPF. Η επανεξέταση αυτής της περιοχής εν συνεχεία αναγνώρισε ένα κοινό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP) (rs35705950) στον προαγωγό του γονιδίου που κωδικοποιεί το Mucin 5B (Muc5B) που συσχετίστηκε με έναν 6-8 φορές αυξημένο κίνδυνο για IPF. Η συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού υποκινητή MUC5B και IPF έχει επιβεβαιωθεί από τότε σε αρκετές ανεξάρτητες ομάδες, κυρίως στους Καυκάσιους (Fingerlin TE, 2013). Επιπροσθέτως, πολυάριθμες ομάδες έχουν επικεντρωθεί σε δειγματοληψία ειδικά στους πνεύμονες ή σε κυκλοφορούντες μοριακούς δείκτες για τη βελτίωση της διάγνωσης της IPF. Αυτοί οι βιοδείκτες περιλαμβάνουν ένζυμα τροποποίησης ECM, όπως MMPs και αποικοδομημένες με MMP πρωτεΐνες. Ο συνδυασμός πνευμονικής επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης D, MMP7 και οστεοποντίνης έχει αποδειχθεί χρήσιμος στο διαχωρισμό των ασθενών με IPF από εκείνους με άλλες διάμεσες πνευμονίες. Τα miRNAs του ορού, μια μεταγραφική υπογραφή του περιφερικού αίματος και οι κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις πρωτεΐνες έχει επίσης προταθεί ότι έχουν πιθανή διαγνωστική αξία (Martinez et al., 2017).

Επιπλέον, έχει εντοπιστεί μια συσχέτιση μεταξύ IPF και της βιολογίας των τελομερών. Η πνευμονική ίνωση εμφανίζεται σε περίπου 20% των ασθενών με dyskeratosis congenita (DC), μια σπάνια κληρονομική γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από λευκοπλακία, αποτυχία μυελού των οστών και δυστροφικά νύχια που τυπικά επηρεάζουν τους νέους άνδρες. Οι σπάνιοι πολυμορφισμοί (Rare Variants - RVs) σε γονίδια που σχετίζονται με τη βιολογία των τελομερών έχουν εμπλακεί στο DC (Calado RT, 2009). Αυτές οι παραλλαγές σε TERT και hTR οδηγούν σε σύντομα τελομερή στο περιφερικό αίμα και στον πνεύμονα. Εκτός από τις παραλλαγές σε TERT και hTR, δύο πρόσφατες αναφορές προσδιόρισαν ασθενείς με FV με RVs στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τη δυσσερίνη (DKC1), ένα άλλο συστατικό του συμπλόκου τελομεράσης (Tsakiri KD, 2007). Οι γενετικές και κλινικές ενδείξεις παρέχουν μια συναρπαστική σχέση μεταξύ της ίνωσης των πνευμόνων και της βιολογίας των τελομερών. Αν και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι RVs της οδού τελομεράσης οδηγούν στην ίνωση του πνεύμονα είναι αβέβαιοι, έχει προταθεί ότι αυτές οι παραλλαγές της απώλειας λειτουργιών διαταράσσουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των πνευμόνων (Driscoll B, 2000).

Πίνακας 3.1

Σπάνιοι γενετικοί τύποι που συνδέονται με IPF

Gene	Reported % of FIP	Reference
<i>TERT</i>	8-15%	[20, 21]
<i>RTEL1</i>	5%	[28]
<i>hTR</i>	<1%	[20, 21]
<i>DKC1</i>	<1%	[23, 24]
<i>TINF2</i>	<1%	[25-27]
<i>SFTPC</i>	2-25%	[13-16, 86, 87]
<i>SFTPA2</i>	<1%	[17]
<i>ABCA3</i>	<1%	[18, 19]
Unknown	75-85%	

Πίνακας 3.12

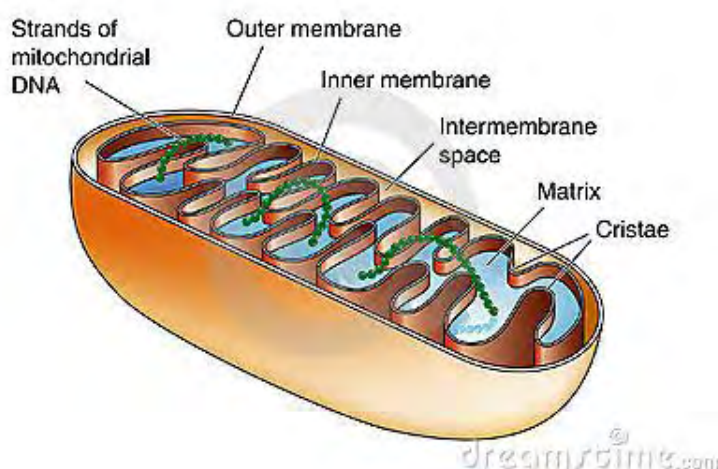
Συνηθισμένοι γενετικοί τόποι που συνδέονται με IPF

Locus	Gene	SNP	IPF Risk	IPF Survival	Reference
2q14	<i>IL1RN</i>	rs408392 rs419598 rs2637988	Y Y Y		[31-33]
3q26	<i>hTR</i>	rs6793295	Y		[40]
4q13	<i>IL8</i>	rs4073 rs2227307	Y Y		[34]
4q22	<i>FAM13A</i>	rs2609255	Y		[40]
4q35	<i>TLR3</i>	rs3775291		Harmful	[35]
5p15	<i>TERT</i>	rs2736100	Y		[40, 112]
6p21 6p21	<i>CDKN1A</i> <i>HLA-DRB1</i>	rs2395655	Y	Harmful Y	[37] [36]
6q24	<i>DSP</i>	rs2076295	Y		[40]
7q22	Intergenic	rs47274443	Y		[40]
10q24	<i>OBFC1</i>	rs11191865	Y		[40]
11p15	<i>MUC5B</i> <i>MUC2</i> <i>TOLLIP</i> <i>TOLLIP</i> <i>TOLLIP</i>	rs35705950 rs7934606 rs111521887 rs5743894 rs2743890	Y Y Y Y Y	Protective Protective	[38-43, 50] [40] [41] [41] [41]
13q34	<i>ATP11A</i>	rs1278769	Y		[40]
14q21	<i>MDGA2</i>	rs7144383	Y		[41]
15q14-15	Intergenic	rs2034650	Y		[40]
17q13	<i>TP53</i> <i>TP53</i>	rs12951053 rs12602273	N N	Harmful Harmful	[37]
17q21 17q21	<i>MAPT</i> <i>SPPL2C</i>	rs1981997 rs17690703	Y Y		[40] [41]
19q13 19q13	<i>DPP9</i> <i>TGFBI</i>	rs12610495 rs1800470	Y N	Harmful	[40] [29, 30]

1.6 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

1.6.1. Μιτοχονδριακό DNA

Το μιτοχόνδριο έχει το δικό του κυκλικό DNA, όπως το βακτηριακό DNA, το οποίο κωδικοποιεί 13 πολυπεπτιδικές υπομονάδες οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, 22 tRNAs και 2 rRNAs. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το mtDNA μπορεί να απελευθερωθεί σε κυτταρόπλασμα ή την κυκλοφορία. Εν συνεχεία δρα ως μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με μιτοχονδριακό τραυματισμό (DAMPs) στην επαγωγή ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος (Kepp et al., 2011 · Nakahira et al., 2011 · Oka et al., 2012; Shimada et al., 2012).



Εικόνα 3. Η βασική δομή των μιτοχονδρίων (<https://mde.biologia.gr/ferma/page/3/>)

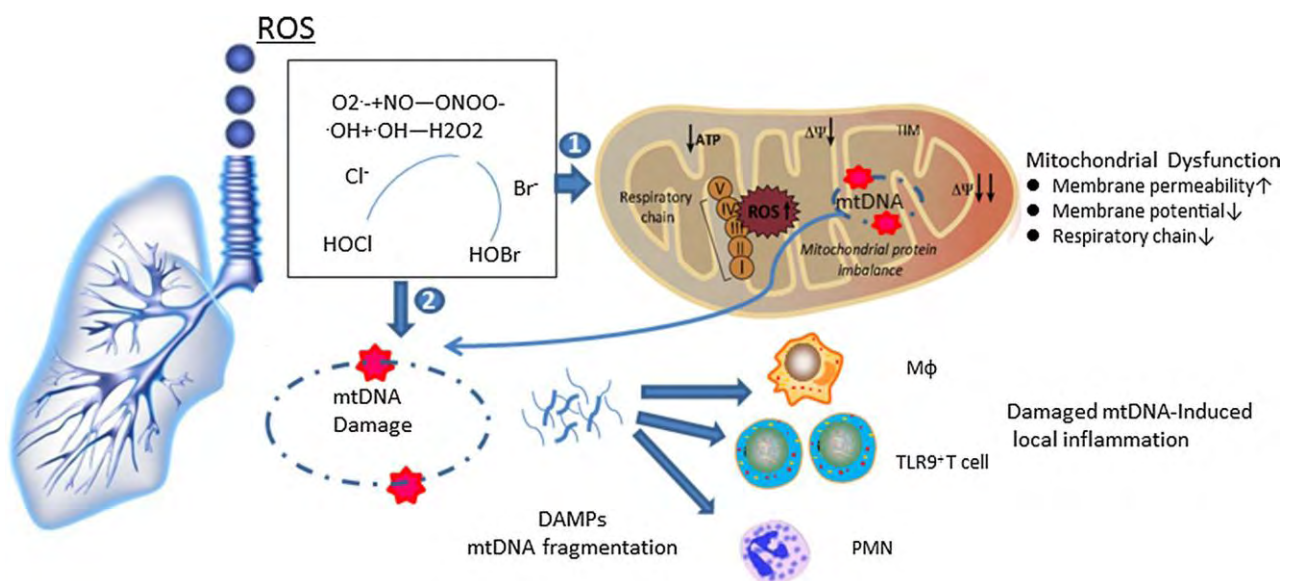
Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο σε οξείδωση από ότι το πυρηνικό, πιθανότατα λόγω εγγύτητας στην πηγή ROS, έλλειψης προστατευτικών ιστονών και ανεπαρκείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Σε σύγκριση με τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια διαθέτουν μικρότερο αριθμό και λιγότερο αποδοτικούς μηχανισμούς διόρθωσης μεταλλάξεων και επιδιόρθωσης βλαβών DNA. Ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) είναι βασικός ρυθμιστής της μεταγραφής και της αντιγραφής του mtDNA. Η διαδικασία παραγωγής mtROS και η βλάβη του mtDNA είναι άρρηκτα συνδεδεμένες, τόσο η οξειδωτική βλάβη όσο και το κυτταρικό στρες ενεργοποιούν μονοπάτια απόπτωσης και γήρανσης που μπορούν να συμβάλλουν, έστω μερικώς, στη γήρανση και την πνευμονική βλάβη, και τελικά στην ίνωση. Το mtDNA περιέχει αλληλουχίες πλούσιες σε CpG, οι οποίες έχουν την ικανότητα να δρουν ως μοριακοί συνοδοί που σχετίζονται με βλάβη και ενεργοποιούν εσωτερικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος όταν διαφεύγουν στο κυτταρικό «διάμεσο». Αυτό το μονοπάτι μπορεί να συμβάλλει στο προϊνωτικό περιβάλλον (Daniel C. Zank et al. 2018).

Τα μιτοχόνδρια είναι εξαιρετικά δυναμικά οργανίδια που περιέχουν εξωτερικές και εσωτερικές μεμβράνες που διαχωρίζουν το διαμεμβρανικό χώρο και τη μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη διπλώνεται πολλές φορές, αυτές οι πτυχές είναι γνωστές ως cristae, και φιλοξενεί την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) που περιέχει πέντε συμπλέγματα πολλαπλών πρωτεϊνών που ονομάζονται σύμπλοκα I-V (Tarasov et al., 2012). Τα μιτοχόνδρια, λειτουργούν κυρίως ως κέντρα παραγωγής της ενέργειας του κυττάρου, συνθέτουν τριφωσφορική

αδενοσίνη (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) (Daniel C. Zank et al. 2018). Τα μιτοχόνδρια ενεργούν ως αποθήκες ασβεστίου, το μιτοχονδριακό ασβέστιο ρυθμίζει τη σύνθεση της ATP (Tarasov et al., 2012). Πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια συγκλίνουν και αλληλοεπιδρούν για να ρυθμίσουν συνδεδεμένες λειτουργίες των μιτοχονδρίων όπως βιογένεση, παραγωγή ROS, διατήρηση και επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) (Daniel C. Zank et al. 2018). Επίσης, αυξανόμενος αριθμός στοιχείων υποδεικνύει ότι τα μιτοχόνδρια έχουν έμμεσο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, την απόπτωση, την έμφυτη ανοσία, τη φλεγμονώδη απόκριση και τη γήρανση (Nunnari and Suomalainen, 2012; Friedman and Nunnari, 2014).

1.6.2. mtROS

Τα mtROS δημιουργούνται κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων που παρέχεται από την οξείδωση των παραγόμενων NADH και FADH₂ κατά τη διάρκεια του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (L. Yue & H. Yao, 2016). Φυσιολογικά, οι μιτοχονδριακές ROS (mtROS) λειτουργούν ως σηματοδοτικός μηχανισμός και έχουν πολλαπλή δράση σε όλα τα σημεία του κυττάρου, που περιλαμβάνει απενεργοποίηση φωσφατασών, επιλεγμένη ενεργοποίηση κινασών και διευκόλυνση της δράσης διαφόρων παραγόντων, όπως HIF-1α, p53, NF-κβ. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα των mtROS έχουν διφασική δράση. Σε χαμηλά επίπεδα, οι mtROS διεγείρουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου, φαινόμενο γνωστό και ως μιτοόρμηση, που δρα προστατευτικά και σχετίζεται με τη μακροζωία και την ανθεκτικότητα σε περίπτωση κυτταρικού τραυματισμού. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ή συνεχόμενη παραγωγή, οι ROS πολλαπλασιάζουν τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούν βλάβες λόγω οξείδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA. Η αποδοτική ρύθμιση της παραγωγής ROS μειώνεται με την ηλικία και ενισχύεται η ευπάθεια σε τραυματισμό του πνευμονικού ιστού και ίνωση. Έχει βρεθεί ότι σε επιθηλιακά κύτταρα τύπου II των κυψελίδων ασθενή με πνευμονική ίνωση υπήρχε μειωμένη δραστηριότητα συμπλόκου I και IV (Daniel C. Zank et al. 2018).



Εικόνα 4. Προτεινόμενο μοντέλο για την παθογένεση που επικεντρώνεται σε μιτοχόνδρια σε πνευμονικές παθήσεις που προκαλούνται από ROS.

Η ρίζα ανιονικού υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με NO για να σχηματίσει το εξαιρετικά δραστικό μόριο υπεροξυνιτρώδους (ONOO⁻). Με την παρουσία ιόντων χλωρίου (Cl⁻) και βρωμίου (Br⁻), τα πολύ επιβλαβή οξειδωτικά παράγονται υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και υποβρωμικό οξύ (HOBr) από υπεροξειδάση υδρογόνου (H₂O₂). (1) Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από ROS: όταν η συγκέντρωση ROS αυξάνει στα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) καθίσταται ελαττωματικό και οδηγεί σε απώλεια δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης και αύξηση διαπερατότητας μεμβράνης. (2) Ανοσολογική απόκριση που συνδέεται με μιτοχονδριακό DNA (mtDNA): κατεστραμμένο mtDNA θραύσματα απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια. Τα ανοσογόνα σωματίδια μπορούν να στρατολογήσουν διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα, τα κύτταρα TLR9-T και τα ουδετερόφιλα, στην περιοχή που υπέστη βλάβη, για να προκαλέσουν φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις (Liu and Chen J Transl Med, 2017).

1.6.3. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Απορρύθμιση πολλών από τους παραπάνω μηχανισμούς που ελέγχουν την μιτοχονδριακή λειτουργία έχουν εντοπιστεί, πρόσφατα, σε επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα σε πνεύμονες ασθενών με IPF. Αυτή η δυσλειτουργία συμβάλλει στην αδυναμία προσαρμογής στο κυτταρικό στρες, οδηγώντας σε ευαισθησία στον τραυματισμό και εξέλιξη των συμπτωμάτων πνευμονικής ίνωσης (Daniel C. Zank et al. 2018). Παρατηρήθηκε ότι αυξημένη παραγωγή mtROS, εξωκυτταρικού ATP και η απελευθέρωση mtDNA προκαλεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις, οι οποίες, με τη σειρά τους, επιδεινώνουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η κύρια περιοχή του διαρροή ηλεκτρονίων είναι το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση), που οξειδώνει το οξυγόνο για να δημιουργήσει ανιόν υπεροξειδίου. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια σύνδεση μεταξύ των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών και των φλεγμονοδών πνευμονολογικών διαταραχών, όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και το άσθμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες και η παραγωγή ROS, δυο διαδικασίες που συνδέονται άμεσα με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (L. Yue & H. Yao, 2016).

1.7 ΣΤΟΧΟΣ

Η συγκεκριμένη έρευνα έχει ως στόχο την διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων με την εμφάνιση της νόσου. Ειδικότερα, έγινε προσπάθεια της εκτίμησης της δραστικότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων.

Το σύμπλοκο I είναι το πρώτο και το μεγαλύτερο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και αποτελείται από περίπου 46 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Αυτή η αντλία πρωτονίων κωδικοεύεται από γονίδια που βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια. Μείωση της δραστικότητας του ενζύμου αυτού μπορεί να σχετίζεται με πληθώρα μιτοχονδριακών ασθενειών και μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στην παραγωγή ATP και στη συσσώρευση ROS.

Η μέτρηση αυτή επιχειρήθηκε σε λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα είναι λευκά αιμοσφαίρια ομοιόμορφα στην εμφάνιση αλλά ποικίλουν σε λειτουργία και περιλαμβάνουν T, B και φυσικά κύτταρα φονιά (Natural Killer cells). Αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων, την άμεση κυτταρομεσολαβούμενη θανάτωση κυττάρων μολυσμένων με ιό και κυττάρων όγκου και ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των λεμφοκυττάρων αυξήθηκαν στο περιφερικό αίμα ασθενών με πνευμονική ίνωση, καθιστώντας πιο εύκολη την απομόνωσή τους. Επίσης, τα λεμφοκύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα καθιστώντας τα καλύτερο στόχο. Τέλος, αποτελεί μια προσπάθεια για τον σχεδιασμό μιας ανώδυνης και άμεσης τεχνικής εξέτασης που θα είναι προσιτή τόσο για τον ασθενή όσο και για τον θεράποντα ιατρό.

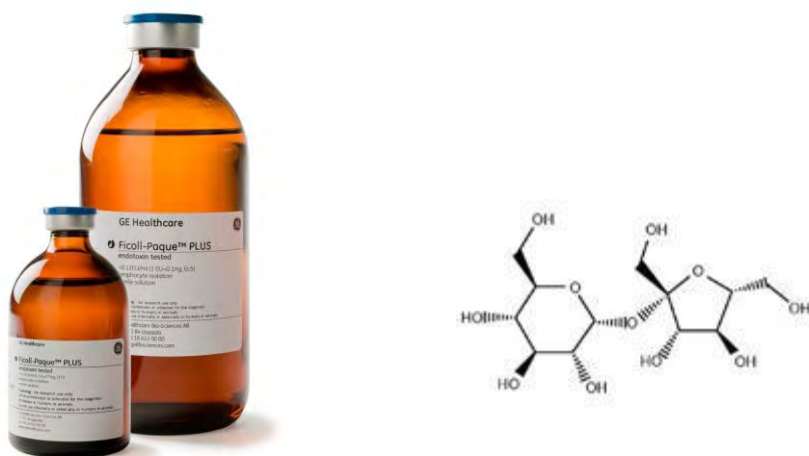
Βασικοί άξονες της μελέτης:

- i. Βελτίωση του πρωτοκόλλου για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος.
- ii. Συγκριτική μελέτη προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από πνευμονική ίνωση και σε υγιή άτομα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

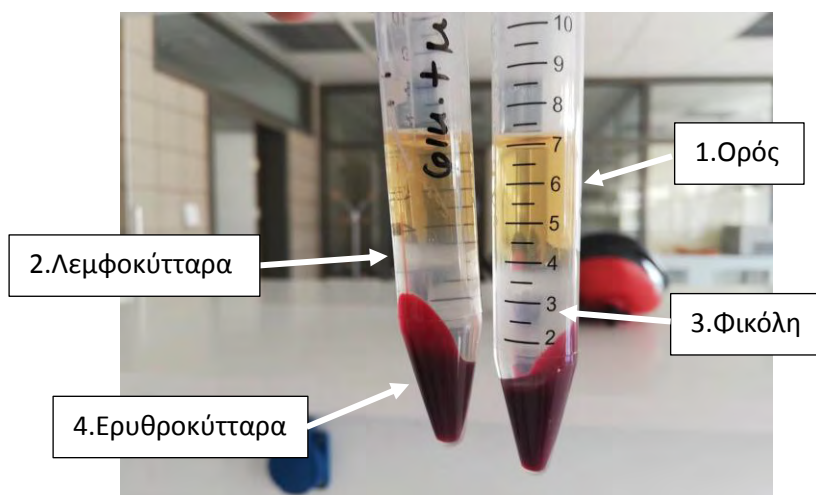
Για την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φυγοκέντρησης πυκνότητας με το αντιδραστήριο φικόλης.



Εικόνα 7. Δοχείο και χημικός τύπος φικόλης

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη διαβάθμιση των κυττάρων που πραγματοποιείται με υγρό μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων. Το υγρό διαχωρισμού έχει ειδικό βάρος αντίστοιχο με το ειδικό βάρος των λεμφοκυττάρων. Η φικόλη επιτρέπει τη διόδο σε ερυθροκύτταρα του αίματος αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα. Με το μέσο αυτό και μετά από φυγοκέντρηση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του δείγματος αίματος σε 4 διακριτές στιβάδες:

- 1) Ορός (ανώτερη στιβάδα)
- 2) Λευκά αιμοσφαίρια (στιβάδα ενδιαφέροντος- άσπρη/ γκρι)
- 3) Φικόλη
- 4) Ερυθροκύτταρα (κατώτερη στιβάδα)



Εικόνα 8. Στιβάδες μετά από φυγοκέντρηση

Υλικά:

- Περιφερικό αίμα παρουσία αντιπηκτικού παράγοντα
- Ficoll- Paque PLUS (Amersham Biosciences 6x100ml – stable for 3 years stored at 4-25°C, **protected from light**)
- PBS 10x
- Tris-HCl 1M pH=7,6
- SHE-PIM
- Falcon 50ml, 15ml
- Φυγόκεντρος
- Πιπέτα Pasteur

Πείραμα:

Αρχικά παρασκευάζουμε τα διαλύματα που θα χρειαστούμε στη συνέχεια, αυτά περιλαμβάνουν PBS 10x, Tris-HCl 1M pH=7,6, SHE-PIM, τα οποία παρασκευάζονται σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες.

PBS 10X 100ml		
Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Αντιδραστήριο (gr)
Na ₂ HPO ₄	1M	14,196
KH ₂ PO ₄	20mM	0,27218
NaCl	1,37M	8,0062
KCl	20mM	0,1491

Υπολογισμοί για δημιουργία PBS stock 100ml

$$C=m/Mr \Rightarrow m=C*Mr$$

ΤΕΛΙΚΑ (gr):

Na₂HPO₄ 1M 100ml m= 14,196

KH₂PO₄ 20mM 100ml m= 0,27218

NaCl με αραίωση από 0,5M stock 100ml: $CV=C'V' \Leftrightarrow V= 1,37M * 0,1l / 0,5M = 68,5ml$

KCl 20mM 100ml m= 0,1491

Παρασκευή 500ml Tris:

- Tris m=60,55 gr

=>στη συνέχεια έγινε ρυθμική με πυκνό HCl στο 7,6

Παρασκευή διαλύματος SHE-PIM 10ml :

Συστατικά (αρχικές συγκεντρώσεις)	Τελική συγκέντρωση στα 10ml
Sucrose	0,85 gr
HEPES (0,1M, pH=7,4)	1ml (10mM)
EDTA (1mM)	20μl (1mM)
PIM	1 tablet

Χρειάστηκε να φτιάξουμε stock HEPES 0,1M και EDTA 0,5M

Υπολογισμοί για stock HEPES 10ml 0,1M pH=7,4:

$C=m/Mr \Leftrightarrow m=C*Mr= 23,83\text{gr} \rightarrow$ για 10ml $m= 0,2383\text{gr}$

Διαλύουμε πρώτα σε 1ml H₂O και μετά προσθέτουμε σταθερά NaOH για ρύθμιση του pH, αν χρειάζεται ακόμα για να φτάσει τα 10ml προσθέτουμε H₂O.

Υπολογισμοί για EDTA 10ml 0,5M:

$C=m/Mr \Leftrightarrow m=C*Mr= 186,12\text{gr} \rightarrow$ για 10ml $m=1,8612\text{gr}$

Πειραματική διαδικασία:

1. Λαμβάνονται 20ml αίματος ασθενών με ίνωση ή υγιών ατόμων με ηπαρινισμένη σύριγγα των 20ml.
2. Σε falcon των 50ml τοποθετούνται 10ml φικόλης και στη συνέχεια βάζουμε τα 20ml αίματος (το αίμα προστίθεται με αργό ρυθμό πάνω στην επιφάνεια της φικόλης, υπό γωνία)
3. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 20 λεπτά χωρίς φρένο στις 1800 στροφές (1800rpm) και στους 20°C.
4. Μετά τη φυγοκέντριση η στιβάδα των λεμφοκυττάρων εντοπίζεται μεταξύ του ορού και φικόλης, που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους από τα ερυθροκύτταρα.
5. Η στιβάδα των λεμφοκυττάρων συλλέγεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε falcon 15ml στο οποίο προστίθεται τριπλάσιος όγκος PBS 1x (περίπου 6ml) προκειμένου να ξεπλυθούν υπολείματα φικόλης, αφού είναι τοξική για τα κύτταρα.
6. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντριση στα 2500rpm για 5 λεπτά στους 20°C.
7. Απομακρύνουμε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου.
8. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε SHE-PIM τριπλάσιου όγκου από το εναπομένον ίζημα.
9. Αποθηκεύουμε σε errendorf 1,5ml στην κατάψυξη, -80°C.



A. Δείγμα αίματος-φικόλης
(Φωτογραφίες αρχείου)



B. Μετά την πρώτη φυγοκέντρωση
στα 1800rpm



Γ. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση
στα 2500rpm.

2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Για την μέτρηση της δραστηρότητας του Συμπλόκου I μετά την προσθήκη NADH στο κυτταρικό ομογενοποίημα πρέπει πρώτα να προσδιορίσουμε την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, καθώς περιέχει πλήθος πρωτεϊνών. Έτσι, η δραστηρότητα οξείδωσης του NADH εκφράζεται ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης του δείγματος που προστίθεται (U/g). Ο καθορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης βασίζεται στην χρωστική Bradford. Η χρωστική αυτή όταν έρχεται σε επαφή με αμινοξικά κατάλοιπα αποκτά ένα χαρακτηριστικό μπλέ χρώμα που μετρείται φωτομετρικά στα 595nm.

Υλικά:

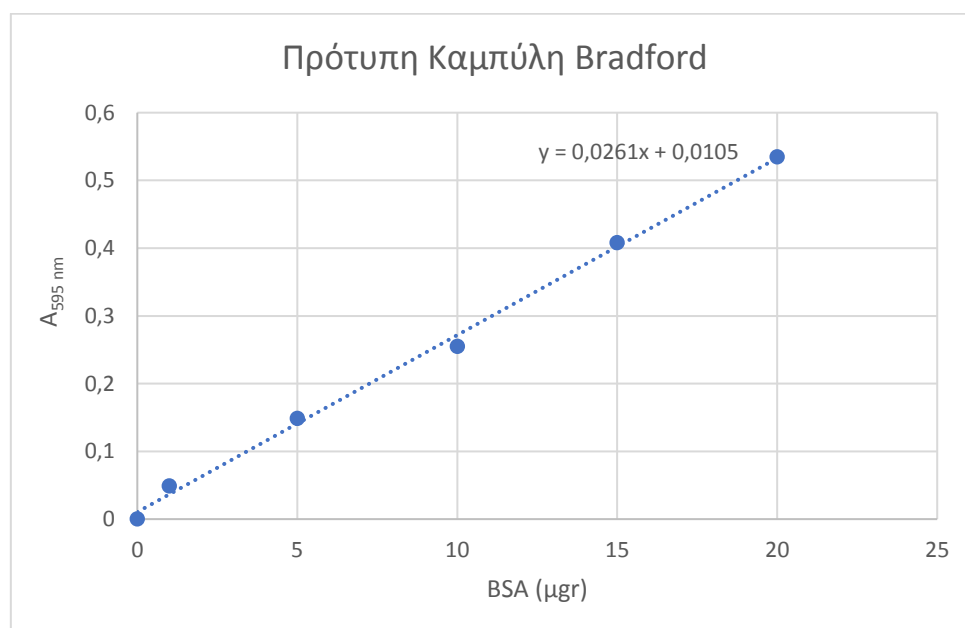
- Φασματοφωτόμετρο
- Κυψελίδα
- Bradford 5x
- SHE-PIM

Πείραμα:

Αρχικά πρέπει να κάνουμε μία καμπύλη αναφοράς. Για το σκοπό αυτό ετοιμάζουμε δείγματα BSA γνωστής συγκέντρωσης, όπως φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

BSA (μl)	0	1	5	10	15	20
Tris (μl)	20	19	15	10	5	0
Bradford 1x (μl)	980	980	980	980	980	980
A _{595nm}	0	0,049	0,1485	0,255	0,408	0,5345

Για το σκοπό αυτό χρειάστηκε να κάνουμε στοκ BSA ml με συγκέντρωση M, δηλαδή gr BSA ανά ml.



2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αύξηση διαπερατότητας

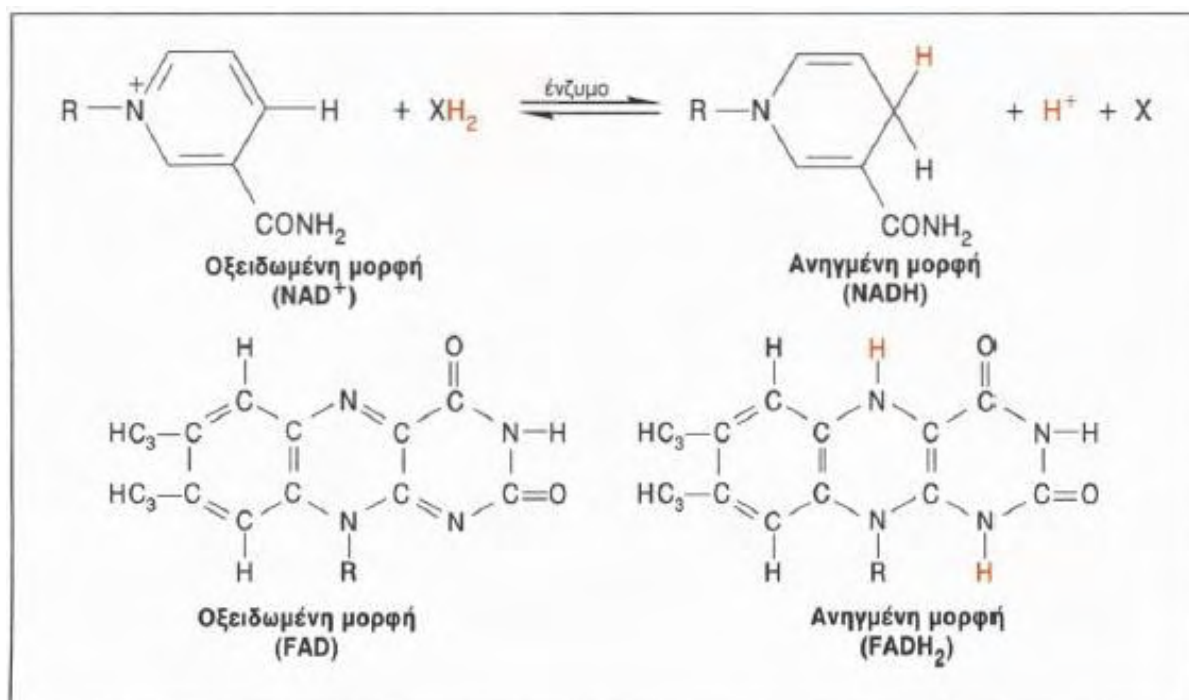
Προκειμένου να γίνει ακριβής μέτρηση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας θα πρέπει το NADH να έχει πρόσβαση στο διαμεμβρανικό χώρο. Συνεπώς, για να αυξηθεί η διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, χρησιμοποιούμε τη μέθοδο των διαδοχικών κύκλων ψύξης-απόψυξης στο ομογενοποίημα των κυττάρων που απομονώσαμε στο προηγούμενο στάδιο. Η απότομη συστολή και διαστολή του νερού εσωτερικά του κυττάρου προκαλεί αποδόμηση των μεμβρανών. Ακόμη, το ισότονο περιβάλλον που προσφέρει το SHE-PIM αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα στη διατήρηση της δομής των μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ της αποδόμησης των μεμβρανών και της διατήρησης στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου. Τα δείγματα παραμένουν στους -80°C για 20 λεπτά, μετά αποψύχονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για άλλα 20 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες δυο φορές για τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης.



Εικόνα 9. Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C

Παρακολούθηση κινητικής οξείδωσης του NADH από το σύμπλοκο I

Η μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση της συγκέντρωσης του NADH, καθώς αυτό οξειδώνεται, στα 340nm. Καθώς η μέτρηση γίνεται σε κυτταρικό ομογενοποίημα υπάρχει η πιθανότητα παρεμβολής διαφόρων NADH-οξειδασών πέρα του Συμπλόκου I. Το πρόβλημα λύνεται με τη χρήση ροτενόνης, η οποία δρα ως εξειδικευμένος αναστολέας του Συμπλόκου I. Έτσι, για το κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δυο μετρήσεις μια παρουσία και μια απουσία ροτενόνης. Η διαφορά της δραστηριότητας οξείδωσης του NADH αντιστοιχεί στη δραστηριότητα του ενζύμου υπο εξέταση.



Εικόνα 10. Οξείδωση NADH (Βιοχημεία Γ' Λυκείου, Κεφάλαιο 7)

Γίνεται μέτρηση της ανηγμένης μορφής και συνεπώς αναμένεται μείωση της απορρόφησης όσο μετατρέπεται στην οξειδωμένη μορφή.

Υλικά:

Φασματοφωτόμετρο UV

Κυψελίδα χαλαζία

Λίστα stock:

- CoQ1 – **stock 2mM σε DMSO στους -20°C**
Mr= 250,29
 $0,002\text{M} \times 250,29 \text{ gr/mol} = 0,50058\text{gr/lt} = 0,005 \text{ gr/ } 10\text{ml}$
- Ροτενόνη – **stock 2mM σε DMSO στους -20°C**
Mr= 394,42
 $0,002 \times 394,42 = 0,788 \text{ gr/lt} = 0,0078 \text{ περίπου } 0,008 \text{ gr/10ml}$
- Αντιμυκίνη-α – **stock 3μM σε DMSO στους -20°C**
Mr= 548,643
 $0,003 \times 548,643 = 1,6459 \text{ gr/lt} = 0,0164 \text{ gr/10ml}$
- BSA – **stock 5% w/v σε H₂O στους -20°C**
 $5\text{mgr/ml} = 0,05 \text{ gr/10ml}$
- MgCl₂ – **stock 0,5M σε H₂O στους 4°C**
Mr= 95,21
 $0,5 \times 95,21 = 47,605 \text{ gr/lt} = 4,76\text{gr/ } 100\text{ml}$
- K₂HPO₄ – **pH= 7,4**
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 100ml που προέκυψε από την ανάμειξη δυο διαλυμάτων σύμφωνα με την αναλογία που φαίνεται στις παρενθέσεις :
Διάλυμα A: K₂HPO₄ x H₂O 1M (80,2ml)
Διάλυμα B: KH₂PO₄ x H₂O 1M (19,8ml)
- KCN - **Stock 1M 1ml**
Mr= 65,12
 $0,06512\text{gr/ml}$ φρέσκο κάθε φορά
- NADH - **Stock 5,7mM 0,5ml**
Mr= 709,4
 $m = 0,002\text{gr/ } 0,5\text{ml}$

Αναλόγως με τον αριθμό των δειγμάτων που θα αναλυθούν δημιουργείται και ο ανάλογος όγκος Premix σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Ο τελικός όγκος της μέτρησης πρέπει να είναι 1ml σε υδατικό δ/μα. Έτσι, για τον όγκο του Premix για μία μέτρηση αφαιρέσαμε από τα 1000μl τον όγκο του NADH, του CoQ1, και άλλα 100μl = (Vδείγματος + Vνερού). Ακόμη, στο Premix προσθέτουμε τον ίδιο όγκο DMSO ή ροτενόνης αναλόγως αν θέλουμε να πραγματοποιήσουμε μέτρηση απουσία ή παρουσία ροτενόνης αντίστοιχα.

Πρωτόκολλο Μέτρησης		
Αντιδραστήριο	Συγκεντρώσεις	Από Στοκ για τελικό όγκο 1ml (σε μl)
K ₂ HPO ₄	20mM	200
BSA	0.2% w/v	60
MgCl ₂	25mM	8
KCN	1.7mM	1,7
Αντιμυκίνη-α	3μM	1
Ροτενόνη/DMSO	15μM	7,5
NADH	200μM	35,1
CoQ ₁	100μM	50
Δείγμα (+H ₂ O)	10%	100

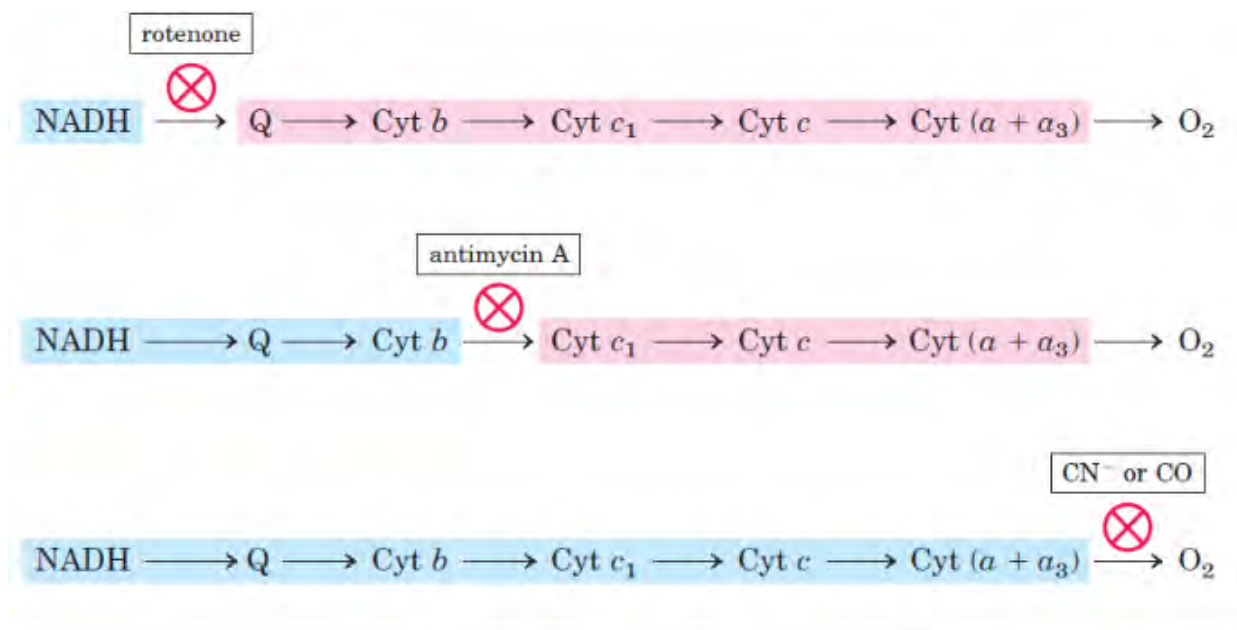
Ο υπολογισμός του όγκου που προσθέτουμε από κάθε stock για το τελικό premix όγκου 1ml υπολογίστηκε με τη βοήθεια του νόμου της αραίωσης $C \times V = C' \times V'$, με:

C: την συγκέντρωση του stock

V: άγνωστο- μl από stock

C': την τελική συγκέντρωση στο 1ml

V': 1ml τελικός όγκος



Εικόνα 11. Αναγωγή με μπλε, οξείδωση με κόκκινο και στα πλαίσια φαίνονται οι αντίστοιχοι αναστολείς (Ηράκλειτος Αλιβιζάτος, 2017, σελίδα 21)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε δώδεκα (12) ασθενείς που πάσχουν από πνευμονική ίνωση (IPF) και 12 υγιών ατόμων (control). Οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη παρακολουθούνται στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ.).

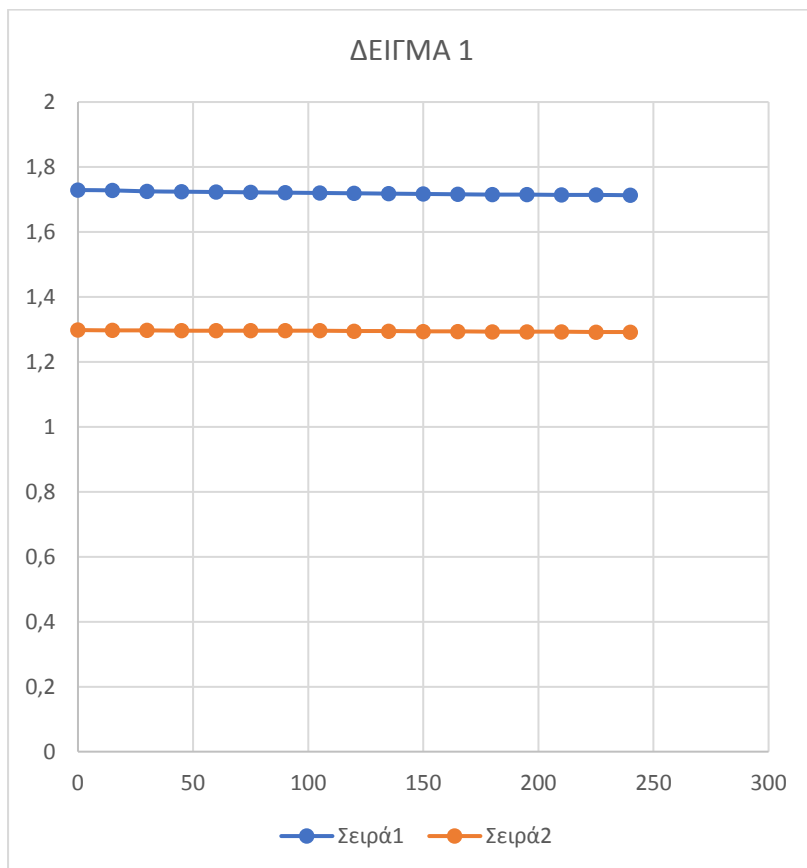
Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I επιλέχθηκε το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ρυθμού οξειδωσης του NADH στα 340nm σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος με 70μgr περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, μετά από 3 κύκλους ψύξης/απόψυξης. Η συγκέντρωση του NADH ήταν στα 90μM. Η μέτρηση έγινε δυο φορές για κάθε δείγμα με και χωρίς παρουσία ροτενόνης. Η διαφορά της απορρόφησης του NADH πριν και μετά την προσθήκη της ροτενόνης αντικατοπτρίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I.

ΔΕΙΓΜΑ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ
1	ΑΝΔΡΑΣ	68
2	ΑΝΔΡΑΣ	76
3	ΑΝΔΡΑΣ	74
4	ΑΝΔΡΑΣ	71
5	ΓΥΝΑΙΚΑ	75
6	ΑΝΔΡΑΣ	63
7	ΑΝΔΡΑΣ	67
8	ΓΥΝΑΙΚΑ	60
9	ΑΝΔΡΑΣ	71
10	ΑΝΔΡΑΣ	74
11	ΑΝΔΡΑΣ	74
12	ΑΝΔΡΑΣ	70

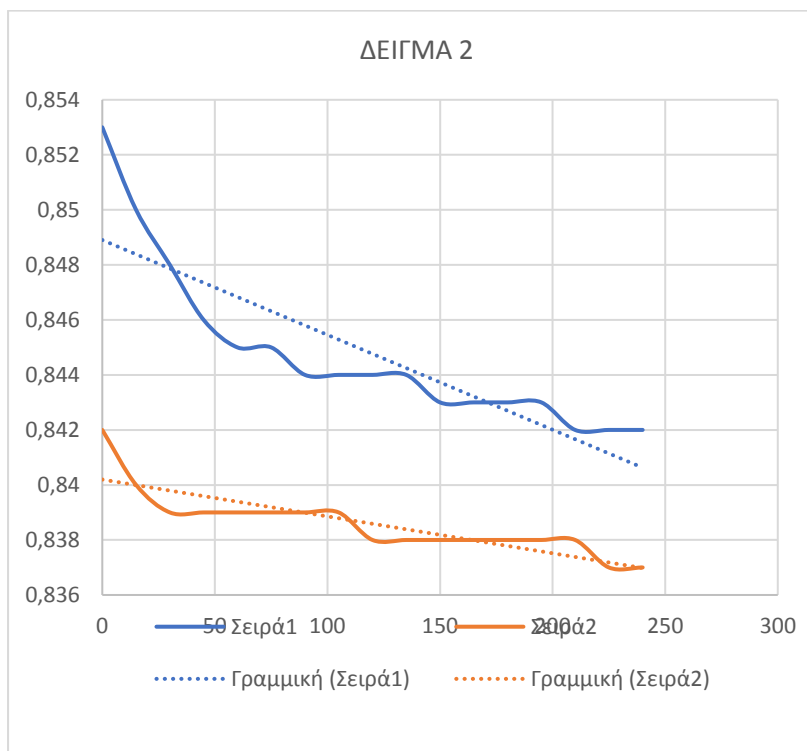
Πίνακας 4. Δείγματα και αντίστοιχα στοιχεία

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις του NADH στα δείγματα ασθενών με πνευμονική ίνωση κατά τη διάρκεια τεσσάρων λεπτών ανά 15 δευτερόλεπτα. Με μπλε χρώμα (—●— / σειρά 1) είναι τα δείγματα χωρίς ροτενόνη, με πορτοκαλί (—●— / σειρά 2) τα ίδια μετά την προσθήκη ροτενόνης. Πάνω από κάθε διάγραμμα αναγράφονται το φύλο και η ηλικία του ασθενούς που εμφανίζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα από πάνω.

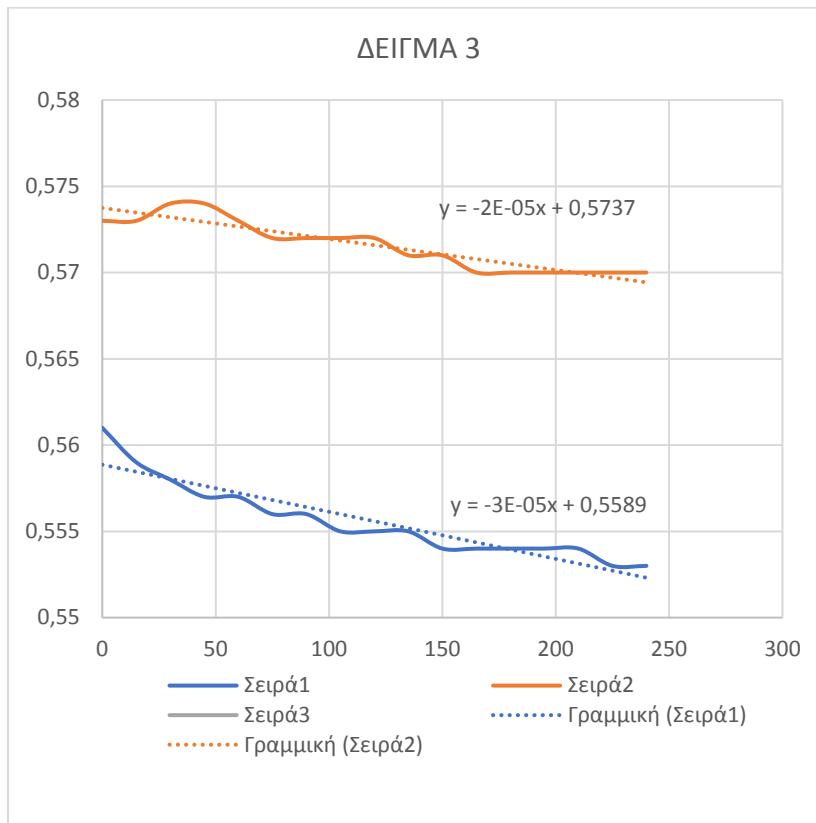
ΔΕΙΓΜΑ 1, παθολογικό, άνδρας 68 ετών



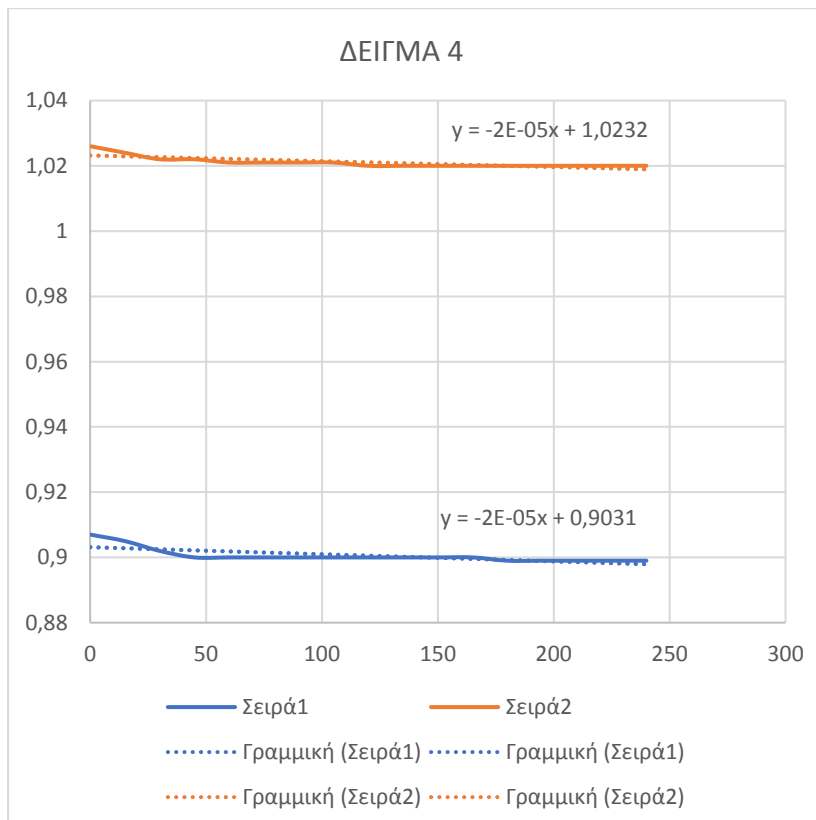
ΔΕΙΓΜΑ 2, παθολογικό, άνδρας 76 ετών



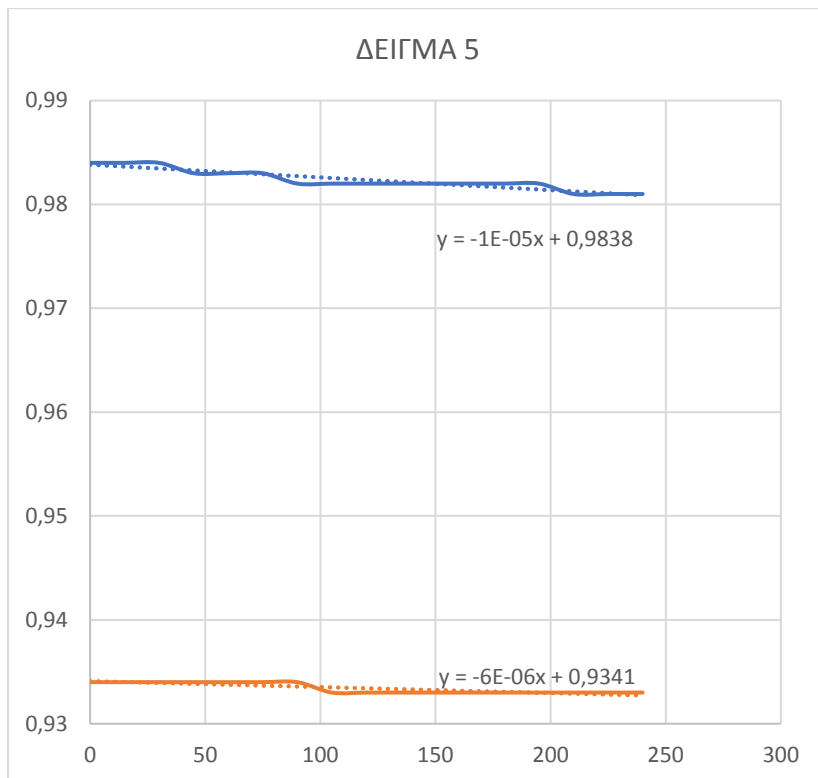
ΔΕΙΓΜΑ 3, παθολογικό, άνδρας 74 ετών



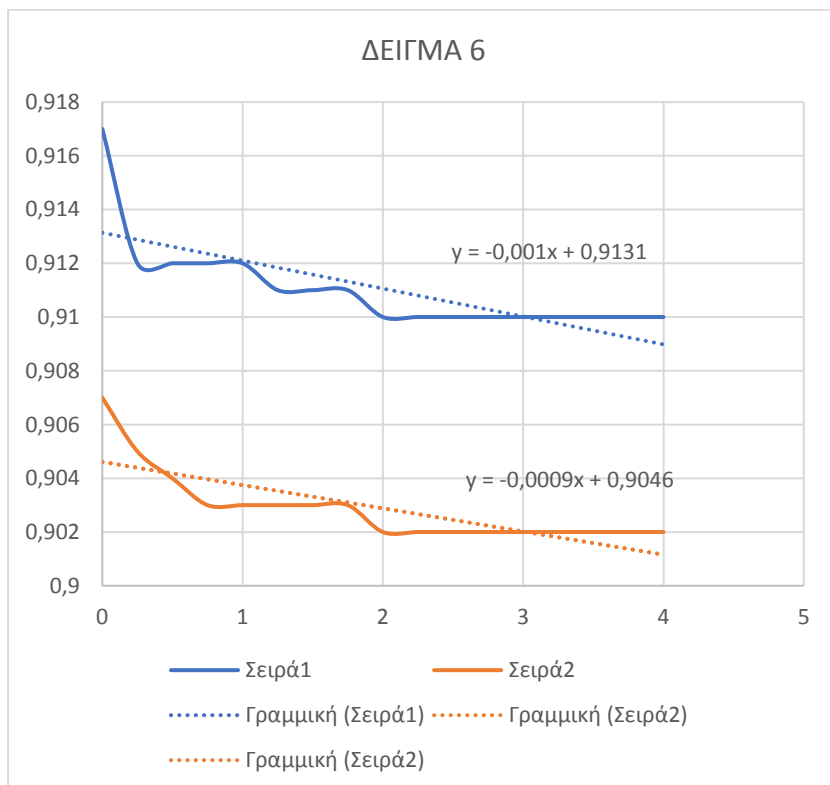
ΔΕΙΓΜΑ 4, παθολογικό, άνδρας 71 ετών



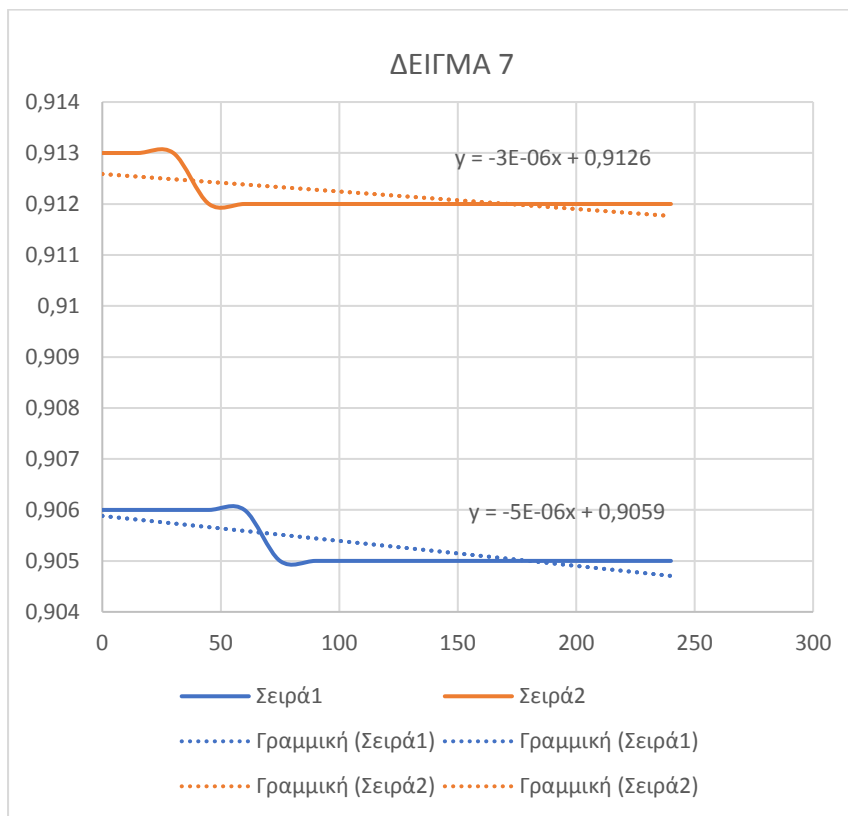
ΔΕΙΓΜΑ 5, παθολογικό, γυναίκα 75 ετών



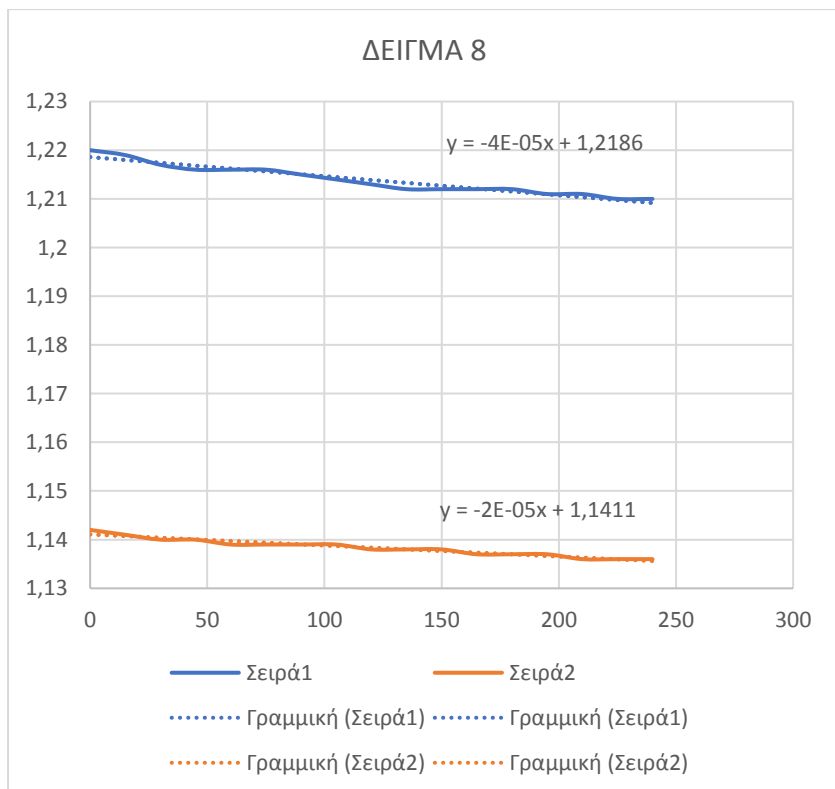
ΔΕΙΓΜΑ 6, παθολογικό, άνδρας 63 ετών



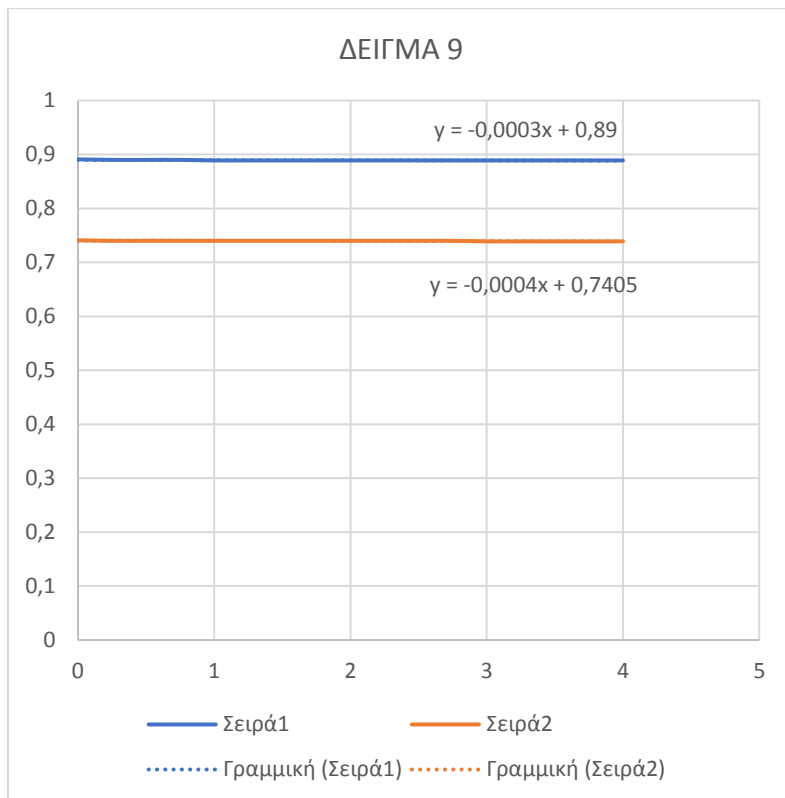
ΔΕΙΓΜΑ 7, παθολογικό, άνδρας 67 ετών



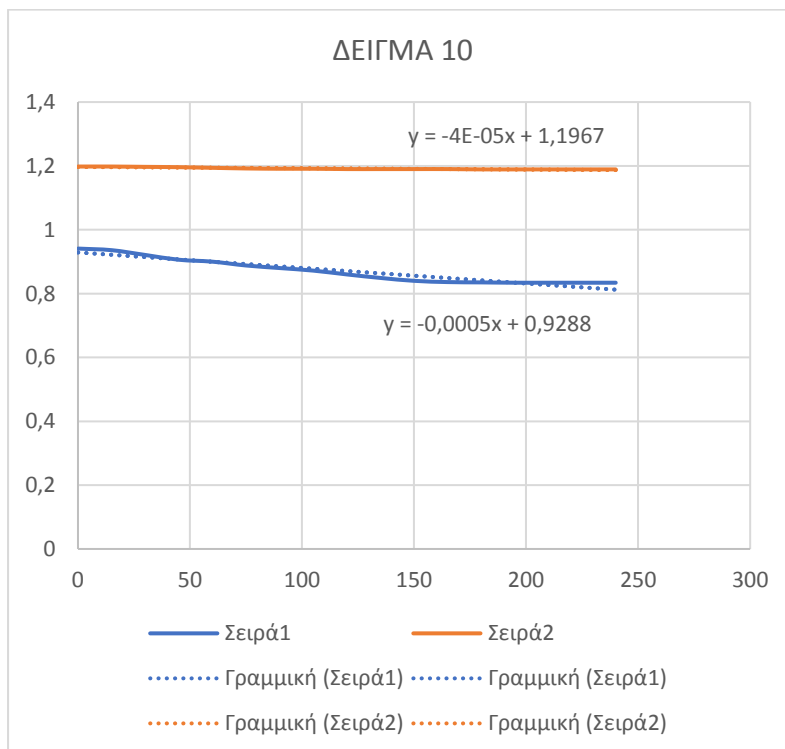
ΔΕΙΓΜΑ 8, παθολογικό, γυναίκα 60 ετών



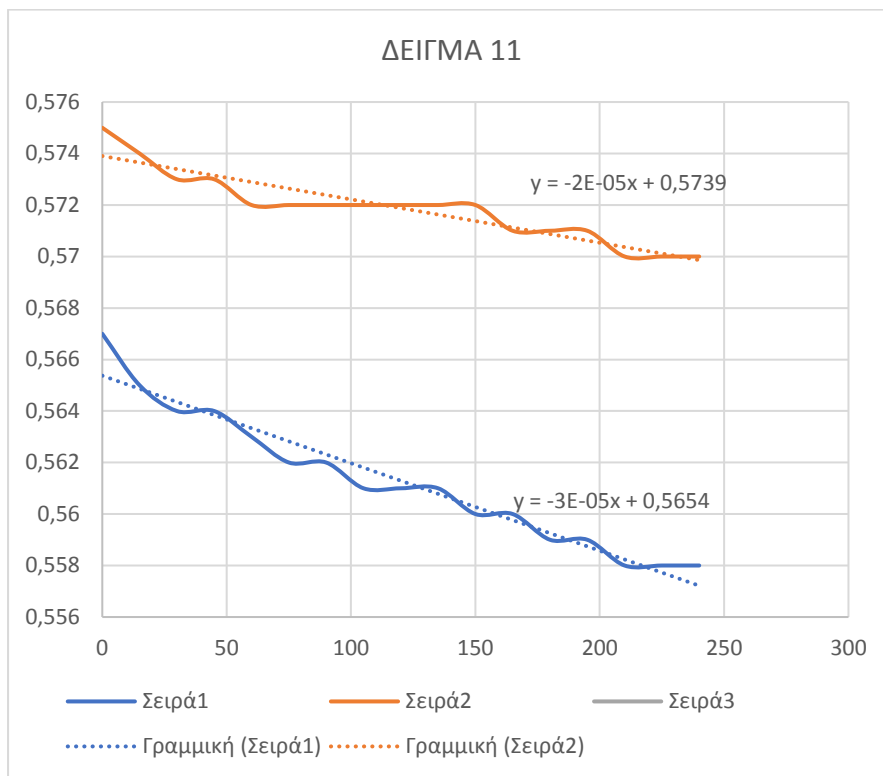
ΔΕΙΓΜΑ 9, παθολογικό, άνδρας 71 ετών



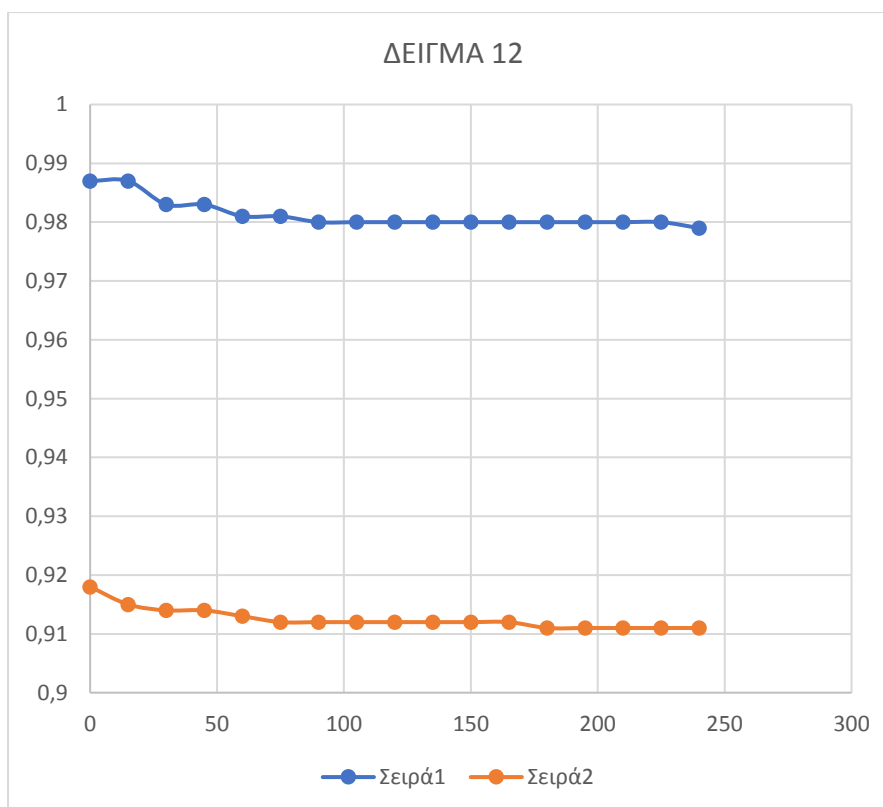
ΔΕΙΓΜΑ 10, παθολογικό, άνδρας 74 ετών



ΔΕΙΓΜΑ 11, παθολογικό, άνδρας 74 ετών



ΔΕΙΓΜΑ 12, παθολογικό, άνδρας 70 ετών



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ

Η ενζυμική ενεργότητα μπορεί να προσδιοριστεί από τη μεταβολή της απορρόφησης (ΔA) με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$E = (\Delta A \times V_t) / (t \times \epsilon \times b)$		
E	mU	Ενζυμική ενεργότητα
ΔA	A/min	Μεταβολή απορρόφησης ανά λεπτό
V_t	ml	Ολικός όγκος μείγματος αντίδρασης
t	min	Χρόνος μετρήσεων
ϵ	$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	Συντελεστής μοριακής απορρόφησης NADH
b	cm	Μήκος οπτικής διαδρομής

Παράδειγμα εφαρμογής για Δείγμα 1:

Rot⁻

$$\Delta A = 0,016 \rightarrow E = (0,016 \times 10^{-6}) / (4 \times 6,22 \times 10^{-3} \times 1) = 6,43 \times 10^{-10} \text{ mU/mL}$$

$$SA_1 = E/\text{mg of protein} = 6,43 \times 10^{-10} / (70 \times 10^{-3}) = 9,2 \text{ nmol/ (min x mg)}$$

Rot⁺

$$\Delta A = 0,006 \rightarrow E = (0,006 \times 10^{-6}) / (4 \times 6,22 \times 10^{-3} \times 1) = 2,41 \times 10^{-10} \text{ mU/mL}$$

$$SA_2 = E/\text{mg of protein} = 2,41 \times 10^{-10} / (70 \times 10^{-3}) = 3,4 \text{ nmol/ (min x mg)}$$

$$\text{totalSA} = SA_1 - SA_2 = 5,8 \text{ nmol/ (min x mg)}$$

Ομοίως έγιναν οι υπολογισμοί και για τα υπόλοιπα δείγματα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

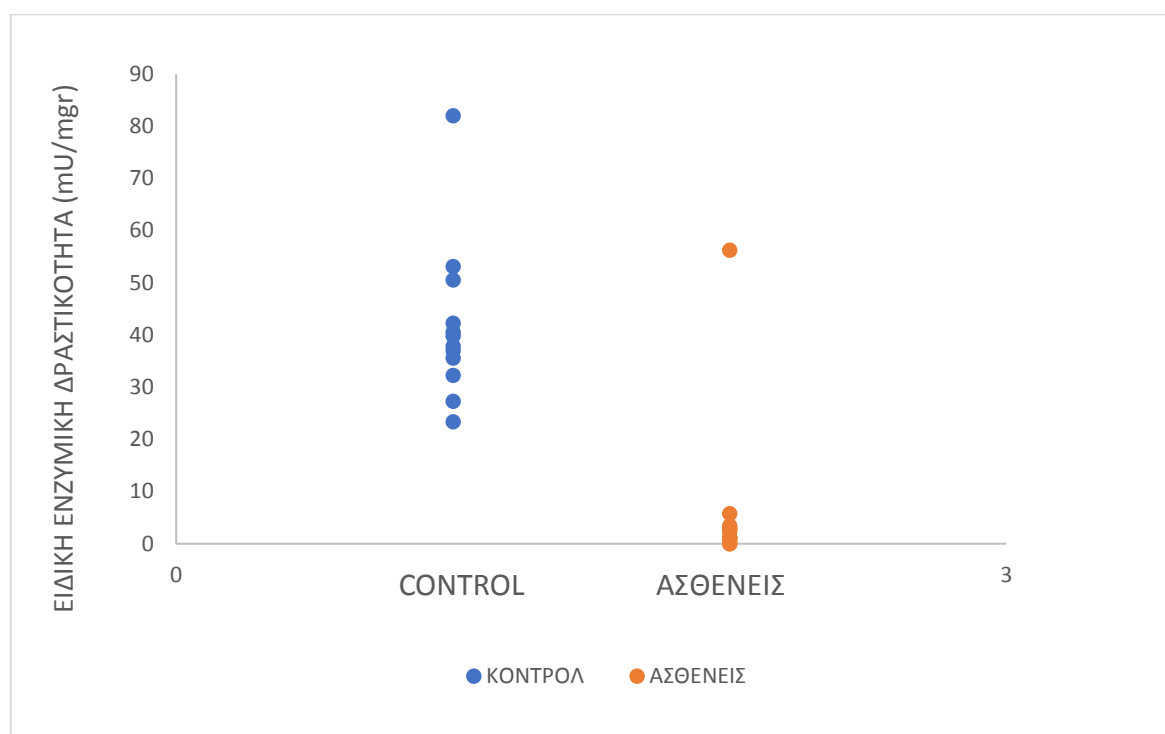
Πίνακας 5. Ειδική ενζυμική δραστηκότητα Συμπλόκου I

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT-	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT+	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
1	9,2	3,4	5,8
2	6,31	2,87	3,44
3	4,6	1,72	2,87
4	4,6	3,4	1,2
5	1,72	0,574	1,146
6	4,02	2,87	1,15
7	0,574	0,574	0
8	5,74	3,4	2,34
9	1,15	1,15	0
10	61,43	5,17	56,26
11	5,17	2,3	2,87
12	4,6	4,02	0,58

Πίνακας 6. Ειδική ενζυμική δραστικότητα υγιών ατόμων ως control για σύγκριση με ασθενείς

ΔΕΙΓΜΑΤΑ (12)	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT-	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT+	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΓΥΝΑΙΚΑ	58	40,14	4,57	35,57
ΓΥΝΑΙΚΑ	50	82,42	3,42	82
ΑΝΤΡΑΣ	55	42,4	4,57	37,83
ΑΝΤΡΑΣ	60	29,1	5,71	23,39
ΑΝΤΡΑΣ	34	35,71	3,44	32,27
ΑΝΤΡΑΣ	21	57,14	4	53,14
ΑΝΤΡΑΣ	27	48,57	6,28	42,29
ΑΝΤΡΑΣ	22	53,97	3,44	50,53
ΑΝΤΡΑΣ	22	49	9,18	39,82
ΓΥΝΑΙΚΑ	60	50	13	37
ΓΥΝΑΙΚΑ	55	37,9	10,6	27,3
ΑΝΤΡΑΣ	57	122,05	81,52	40,53

Διάγραμμα 2. Συνολική αποτύπωση και σύγκριση αποτελεσμάτων



Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής η διαφορά της δραστικότητας του Συμπλόκου I μεταξύ ασθενών με πνευμονική ίνωση και υγιών ατόμων. Στους ασθενείς τα αποτελέσματα αποτυπώνουν εξαιρετικά μειωμένη ενεργότητα της τάξεως του 85% σε σχέση με τα υγιή δείγματα. Βέβαια, πρέπει να συνυπολογίσουμε τον παράγοντα της ηλικίας, καθώς αρκετά δείγματα είχαν μεγάλη ηλικιακή απόκλιση από τους αντίστοιχους ασθενείς. Οι υγιείς ήταν πολύ πιο νέοι και συνεπώς είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίζουν υψηλά επίπεδα λειτουργικότητας.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πνευμονική ίνωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλεί εμφάνιση δομής «κρηθήρας» στο πνευμονικό επιθήλιο. Σημαντικός αριθμός μελετών έχει συνδέσει το οξειδωτικό στρες με την παθογένεση της νόσου, ενώ πιο συγκεκριμένα υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του οξειδωτικού στρες στην ενεργοποίηση κυτοκινών και κατ' επέκταση σε φλεγμονώδη απόκριση. Είναι γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κεντρικό σημείο παραγωγής ROS στο κύτταρο αποτελεί η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας θα μπορούσε να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή ATP ενισχύοντας τη δημιουργία ουλώδους ιστού σε ασθενείς. Οι παραπάνω παρατηρήσεις στρέφουν το ενδιαφέρον της μελέτης στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων.

Ένα από τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας που φαίνεται να συνδέεται συχνότερα με μιτοχονδριακές ασθένειες, και όχι μόνο, είναι το σύμπλοκο I, το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Σε προηγούμενες μελέτες έχει εντοπιστεί υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στα αντίστοιχα μιτοχονδριακά t-RNA γονίδια, αλλά και σε άλλα γειτονικά. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ένζυμο για την παρούσα έρευνα. Στην μελέτη αυτή επιχειρήσαμε να εξετάσουμε την ενζυμική δραστικότητα του συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση σε σύγκριση με υγιή άτομα.

Το σημείο εισόδου για την ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα είναι το σύμπλοκο I μέσω της οξείδωσης του NADH και της μεταφορά των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του NADH στα 340 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποίηση λεμφοκυττάρων, παρουσία και απουσία ροτενόνης. Η ροτενόνη αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I σε σημαντικό ποσοστό. Η χρήση της ροτενόνης είναι απαραίτητη για να αποκλείσουμε τη μέτρηση δραστικότητας άλλων ενζύμων που μπορεί να παράγουν NADH, πέραν του βασικού στόχου. Η λύση των κυττάρων έγινε με διαδοχικούς κύκλους ψύξης- απόψυξης, για να είναι προσβάσιμα τα μιτοχόνδρια από τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα των δειγμάτων.

Οι μετρήσεις έγιναν σε 12 ασθενείς με πνευμονική ίνωση και 12 υγιή άτομα (control). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν μειωμένη ενεργότητα του συμπλόκου I σε άτομα που φέρουν τη νόσο σε σχέση με υγιείς δότες. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός και απαιτείται επανάληψη με περισσότερα δείγματα για διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την δραστικότητα του συμπλόκου I.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Hogan BLM et al., “Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function.”, *Cell Stem Cell* 2014;15:123–138.
- Partridge L, et al., “Facing up to the global challenges of ageing.”, *Nature* 2018;561:45–56.
- Miller MR., “Structural and physiological age-associated changes in aging lungs.”, *Semin Respir Crit Care Med*. 2010 Oct;31(5):521-7. doi: 10.1055/s-0030-1265893. Epub 2010 Oct 12.
- Proença de Oliveira-Maul J et al., “Aging, diabetes, and hypertension are associated with decreased nasal mucociliary clearance.” *Chest* 2013;143:1091–1097.
- Gelb AF et al., “Unravelling the pathophysiology of the asthma-COPD overlap syndrome: unsuspected mild centrilobular emphysema is responsible for loss of lung elastic recoil in never smokers with asthma with persistent expiratory airflow limitation.”, *Chest* 2015;148:313–20.
- Gelb AF, Licuanan J, Shinar CM, et al., “Unsuspected loss of lung elastic recoil in chronic persistent asthma.”, *Chest* 2002;121:715–21.
- Selman M, Rojas M, Mora AL, et al., “Aging and interstitial lung diseases: Unravelling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis.”, *Semin Respir Crit Care Med* 2010;31:607–17.
- Sies H. (2000), “What is Oxidative Stress?”, In: Keaney J.F. (eds) *Oxidative Stress and Vascular Disease. Developments in Cardiovascular Medicine*, vol 224. Springer, Boston, MA
- V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, “Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health”, *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126, doi: 10.4103/0973-7847.70902
- Hee Sun PARK So Ri KIM Yong Chul LEE, “Impact of oxidative stress on lung diseases”, *Respirology*, Wiley online library, December 2008, doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01447
- Liu X, Chen Z., “The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases.”, *J Transl Med*. 2017 Oct 13;15(1):207. doi: 10.1186/s12967-017-1306-5.
- Martinez FJ et.al, “Idiopathic pulmonary fibrosis”, *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 20; 3:17074, doi: 10.1038/nrdp.2017.74
- Brett Ley and Harold R Collard, “Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis”, *Clin Epidemiol*. 2013; 5: 483–492, doi: 10.2147/CLEP.S54815
- MS Wilson and TA Wynn, “Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation”, *Mucosal Immunol*. 2009 Mar; 2(2): 103–121, doi: 10.1038/mi.2008.85
- Murray LA, “Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2.”, *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2174-82. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.016, Epub 2008 Feb 23.

- Agostini C, Gurrieri C, “Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis.”, *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun;3(4):357-63.
- Belkin et al., “Assessing exertional dyspnea in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.”, *Respir Med*. 2014 Jan;108(1):181-8. doi: 10.1016/j.rmed.2013.12.009. Epub 2013 Dec 24.
- Lamas, D. J. et al., “Delayed access and survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a cohort study.”, *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 1;184(7):842-7. doi: 10.1164/rccm.201104-0668OC.
- Flaherty, K. R. et al., “Idiopathic interstitial pneumonia: what is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis?”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 170, 904–910 (2004).
- Wells, A. et al., “Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography.”, *Am. J. Resp Crit. Care Med*. 167, 962–969 (2003).
- Ley, B. et al., “A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis.”, *Ann. Intern. Med*. 156, 684–691 (2012).
- Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G (2011). “Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome.”, *Nat Immunol* 12: 199–200.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC et al. (2011). “Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP inflammasome.”, *Nat Immunol* 12: 222–230.
- Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S et al. “Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis.”, *Immunity* 36: 401–414, (2012)
- Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai Tet al. “Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.” *Nature* 485: 251–255, (2012)
- Daniel C. Zank, Marta Bueno, Ana L. Mora, and Mauricio Rojas, “Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aging, Mitochondrial Dysfunction, and Cellular Bioenergetics”, *Front Med (Lausanne)*, 2018 Feb 5. doi: 10.3389/fmed.2018.00010
- Tarasov et al., “Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+).”, *Cell Calcium*. 2012 Jul;52(1):28-35. doi: 10.1016/j.ceca.2012.03.003. Epub 2012 Apr 12.
- Nunnari and Suomalainen, “Mitochondria: in sickness and in health.”, *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035
- Friedman and Nunnari, “Mitochondrial form and function.”, *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):335-43. doi: 10.1038/nature12985.
- L. Yue & H. Yao, “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition).”, *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

- Fingerlin TE, “Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.”, *JAMA*. 2013 Jun 5;309(21):2232-9. doi: 10.1001/jama.2013.5827.
- Calado RT, “Telomere diseases.”, *N Engl J Med*. 2009 Dec 10;361(24):2353-65. doi: 10.1056/NEJMra0903373.
- Tsakiri KD, “Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase.”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7552-7. Epub 2007 Apr 25.
- Driscoll B, “Telomerase in alveolar epithelial development and repair.”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Dec;279(6):L1191-8.
- Bringardner BD1, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB., “The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis.”, *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):287-301.
- Daniil Z, Kotsiou OS et al., “Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis.”, *Mitochondrion*. 2018 Nov;43:43-52. doi: 10.1016/j.mito.2018.10.004. Epub 2018 Oct 26.
- Zifa E, Giannouli S et al., “Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations.”, *RNA Biol*. 2007 Jan-Mar;4(1):38-66. Epub 2007 Jun 6.
- Wei Zhou, Yaping Wang, “Candidate genes of idiopathic pulmonary fibrosis: current evidence and research”, *The Application of Clinical Genetics*, Dovepress, 2 February 2016
- Mohammad Hadi Zarei, Seyed Farshad Hosseini Shirazi, Marjan Aghvami,
- Ahmad Salimi & Jalal Pourahmad, “Analysis of Cytotoxic Effects of Nickel on Human Blood Lymphocytes”, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2017, DOI: 10.1080/15376516.2017.1364314
- Li Yue and Hongwei Yao, “Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases”, *British Journal of Pharmacology* (2016) 173 2305–2318
- Seok-Jo Kim, Paul Cheresch, “The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis”, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 21486-21519; doi:10.3390/ijms160921486
- Herbert B. Schiller, Daniel T. Montoro et al., “The Human Lung Cell Atlas - A high-resolution reference map of the human lung in health and disease”, Published on 17-April-2019 as 10.1165/rcmb.2018-0416TR
- Aline Lourenso Baptista, Edwin Roger Parra et al., “Structural Features of Epithelial Remodeling in Usual Interstitial Pneumonia Histologic Pattern”, *Lung* (2006) 184:239–244, DOI 10.1007/s00408-005-2585-9
- Stefan W. Ryter, Ivan O. Rosas et al., “Mitochondrial Dysfunction as a Pathogenic Mediator of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis”, *Ann Am Thorac Soc*. 2018 Dec;15(Supplement_4):S266-S272. doi: 10.1513/AnnalsATS.201808-585MG.